

**Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α
hemmt die Proliferation und induziert Apoptose in
der β -Zelllinie INS-1**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches
Bio- und Geowissenschaften,
Landschaftsarchitektur

an der

Universität-Duisburg-Essen

vorgelegt von

Dipl.Biochem.

Silke Erdmann

aus Düsseldorf

März 2005

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) in der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie der Universität-Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

Thomas,H., Senkel,S., Erdmann,S., Arndt,T., Turan,G., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2004). **Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line.** Nucleic Acids Res. 32, e150.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I | Einleitung | 1 |
| 1 | Transkriptionsfaktoren und die Regulation der Genexpression | 1 |
| 2 | Kernrezeptoren | 2 |
| 3 | Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α | 3 |
| 3.1 | Struktur und Spleißformen des HNF4 α Genes | 3 |
| 3.2 | Funktion und Zielgene von HNF4 α | 5 |
| 4 | Diabetes mellitus | 6 |
| 4.1 | Diabetes mellitus und die β -Zellen des Pankreas | 6 |
| 4.2 | MODY | 8 |
| 5 | HNF4 α , ein Regulator des Zellwachstums in β -Zellen? | 10 |
| 6 | Zielsetzung der Arbeit | 11 |
| II | Material und Methoden | 13 |
| 1 | Chemikalien, Puffer, Oligonukleotide und Enzyme | 13 |
| 2 | Antikörper | 14 |
| 3 | Vektorkonstrukte | 14 |
| 4 | RNA Isolierung | 15 |
| 5 | RT-PCR | 15 |
| 6 | PCR | 16 |
| 7 | Real time PCR | 16 |
| 8 | Microarray Analysen | 17 |
| 9 | Herstellung von Gesamtzellextrakten | 18 |
| 10 | Immunoblotanalyse | 18 |
| 11 | Zellkultur | 19 |
| 11.1 | Medien und Zelllinien | 19 |
| 11.2 | Kultivierung der Zellen | 20 |
| 11.3 | Zellzahlbestimmung | 20 |
| 11.4 | Transfektionen | 20 |
| 11.5 | Etablierung stabiler INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien | 21 |
| 12 | Immunfluoreszenz Analysen | 21 |
| 12.1 | Standard Protokoll | 21 |
| 12.2 | Nachweis von Insulin | 22 |
| 12.3 | Nachweis der Mutante R154X | 22 |
| 12.4 | Detektion mit dem anti-HNF4 α und anti-AIF Antikörper | 22 |
| 12.5 | Antikörper Verdünnungen | 23 |
| 12.6 | Vorbereitung der Deckgläser | 23 |
| 13 | Ölrot O Färbung | 23 |
| 14 | MTS Assay | 23 |
| 15 | Luciferase Assay | 24 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 16 | Caspase 3/7 Assay | 24 |
| 17 | DNA-Leiter Assay | 24 |
| 18 | Durchflußzytometrische Methoden | 25 |
| 18.1 | BrdU Assay | 25 |
| 18.2 | Propidium-Iodid Färbung | 25 |
| 19 | siRNA | 25 |
| III | Ergebnisse | 27 |
| 1 | Die Doxycyclin-induzierte Expression von HNF4α hemmt von INS-r3 Zellen | 27 |
| 1.1 | Stabile von INS-1 Zellen abgeleitete INS-r3 Zellklone exprimieren induzierbar HNF4 α und eine dominant-negative Mutante | 27 |
| 1.2 | Die induzierte Expression von HNF4 α hemmt das Zellwachstum der INS-1 Zellen | 29 |
| 1.3 | Nachweis des Insulingehaltes der INS-r3 Zellklone | 29 |
| 2 | Etablierung von INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien zur konditionellen Expression von HNF4α Derivaten | 30 |
| 3 | Die Expression von HNF4α führt zu morphologischen Veränderungen von INS-1 Zellen | 36 |
| 4 | Die Expression von HNF4α hemmt das Wachstum der INS-1 Zellen | 37 |
| 5 | Die Expression von HNF4α führt zu einer Verringerung der Proliferationsrate von INS-1 Zellen | 40 |
| 6 | Die Expression von HNF4α induziert Apoptose in INS-1 Zellen | 41 |
| 6.1 | Der Anteil hypodiploider Zellen nimmt bei HNF4 α 2 Expression zu | 41 |
| 6.2 | HNF4 α 2 Expression führt zu internukleosomaler DNA-Spaltung in INS-1 Zellen | 42 |
| 6.3 | HNF4 α 2 und HNF4 α 8 steigern die Aktivität von Caspase 3/7 | 43 |
| 7 | Zielgene von HNF4α2 und HNF4α8 | 44 |
| 7.1 | Microarray Analysen | 44 |
| 7.2 | Microarray Analysen zum Vergleich der Expressionsprofile von HNF4 α 2, HNF6 und HNF1 β in INS-1 Zellen | 48 |
| 7.3 | Microarray Zielgen-Kandidaten mit Verbindung zu Zellproliferation oder Apoptose | 52 |
| 7.4 | Bestätigung ausgewählter Zielgen-Kandidaten durch real time RT-PCR | 53 |
| 7.5 | Nachweis des AIF Proteins in Flp-In T-REx INS-1 Zellen | 56 |
| 8 | Vermitteln die Zielgene KAI1 oder AIF die apoptotischen und antiproliferativen Effekte von HNF4α? | 57 |
| 8.1 | Etablierung stabiler Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien zur konditionellen Expression von KAI1 und AIF | 57 |
| 8.2 | Morphologische Veränderungen von INS-1 Zellen nach Expression von KAI1 und AIF | 60 |
| 8.3 | Auswirkungen der Expression von KAI1 und AIF auf das Wachstum von INS-1 Zellen | 60 |
| 8.4 | Auswirkung der Expression von KAI1 und AIF auf die Caspase 3/7 Aktivität | 61 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 8.5 | Einsatz von siRNA zur Verminderung der Expression von endogenem KAI1 und AIF | 62 |
| IV | Diskussion | 66 |
| 1 | HNF4 α hemmt das Wachstum von INS-1 Zellen in verschiedenen Expressionssystemen | 66 |
| 1.1 | Doxycyclin-induzierte Expression von HNF4 α in INS-r3 Zellen..... | 66 |
| 1.2 | INS-1 T-REx Flp-In Zelllinien | 66 |
| 2 | HNF4 α beeinflusst die Morphologie von INS-1 Zellen..... | 68 |
| 3 | HNF4 α verringert die Proliferationsrate und induziert Apoptose in INS-1 Zellen | 69 |
| 4 | Microarray Analysen identifizieren Zielgene von HNF4 α in β -Zellen | 70 |
| 4.1 | Die Microarray Daten sind aussagekräftig | 70 |
| 4.2 | HNF4 α 2 und HNF4 α 8 regulieren die gleiche Gruppe von Genen | 73 |
| 4.3 | Die Induktion von HNF4 α 2 mit 1 μ g/ μ l Tetracyclin führt zur Aktivierung zusätzlicher Zielgene | 74 |
| 4.4 | In den nicht-induzierten INS-1 T-REx Flp-In HNF4 α Zelllinien ist eine geringe Zahl von Genen bereits reguliert..... | 74 |
| 5 | Kandidaten für die Vermittlung der HNF4 α -abhängigen Effekte auf das Zellwachstum | 75 |
| 5.1 | Der Apoptose-induzierende Faktor AIF | 75 |
| 5.2 | Der Metastasen-Suppressor KAI1 | 77 |
| 5.3 | Andere Kandidaten | 79 |
| 6 | Die Funktion von HNF4 α in MODY – ein Modell | 80 |
| V | Zusammenfassung..... | 83 |
| VI | Literaturverzeichnis..... | 85 |
| VII | Anhang - Microarray Daten..... | 95 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AIF | Apoptosis Inducing Factor |
| bp | Basenpaare |
| CMV | Cytomegalovirus-Promotor |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5`-triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DN | Dominant-Negativ |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N`N`-tetraessigsäure |
| EGFP | Enhanced Green Fluorescence Protein |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure |
| HNF | Hepatocyte Nuclear Factor |
| IPF/PDX | Insulin Promoting Factor |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| MODY | Maturity Onset Diabetes of the Young |
| mRNA | Messenger RNA |
| OD | Optische Dichte |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase PCR |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| siRNA | Small Interfering RNA |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan |

I EINLEITUNG

1 Transkriptionsfaktoren und die Regulation der Genexpression

In einem mehrzelligen Organismus verfügen alle Zellen über dieselbe genetische Ausstattung. Die Differenzierung verschiedener Zelltypen und die Ausbildung von spezialisierten Organen und Geweben, die in höheren Organismen zusammenwirken, wird durch eine komplexe Regulation der Genexpression ermöglicht. So werden von den etwa 30.000 Genen, die höhere Eukaryonten besitzen, in einer individuellen Zelle jeweils nur ca. 15 % zu einer bestimmten Zeit exprimiert. Welche Gene aktiviert werden, hängt auch vom Entwicklungszustand des Organismus und von aktuellen Umwelteinflüssen ab. Die wesentlichen Elemente der Regulation der Genexpression sind trans-wirkende DNA-Bindungsproteine, die Transkriptionsfaktoren, die an spezifische, cis-wirkende DNA-Sequenzen binden und so den Transkriptionsprozess positiv oder negativ beeinflussen. Cis-wirkende DNA-Elemente können distal oder proximal zur Transkriptionsstartstelle oder in manchen Fällen sogar in der transkribierten Region liegen. Regulatorische DNA-Sequenzen, die in der Nähe des Promotors liegen sind orientierungsabhängig und werden als „upstream activating sequences“ (UAS) bezeichnet, während weit entfernt liegende, orientierungsunabhängige Sequenzen Enhancer genannt werden. Meist sind an der Regulation der Expression eines Genes mehrere Transkriptionsfaktoren beteiligt, die an verschiedene Erkennungssequenzen binden und eine kooperative Kontrolle der Transkription erlauben. Zusätzliche Komplexität der Regulation entsteht durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit Koaktivatoren oder Korepressoren.

Für die Transkriptionsaktivierung ist außerdem die Konformation des Chromatins von entscheidender Bedeutung, nur bestimmte Chromatinstrukturen machen die DNA für die Transkriptionsfaktoren und den Initiationskomplex zugänglich. Die reversible Acetylierung von Histon-Lysinen, die von Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) reguliert wird, erhöht die Transkriptionsaktivität, während reversible Phosphorylierung von Histon-Serinen und -Threoninen, ebenso wie die Methylierung von DNA, die Transkription hemmt. Enzyme, die an dieser Modulation der Chromatinstruktur beteiligt sind, können als Koaktivatoren oder Korepressoren von Transkriptionsfaktoren auftreten. Bei verschiedenen transkriptionsregulierenden Proteinen wie TFII250 und p300/CBP sowie den Hormonrezeptor Koaktivatoren ACTR und SRC-1 wurde eine intrinsische HAT Aktivität festgestellt (Kuo et al., 1998; Wang et al., 1998a; Wang et al., 1998b; Chen et al., 1999)

2 Kernrezeptoren

Die Kernrezeptoren umfassen eine große Familie von evolutionär konservierten Transkriptionsfaktoren, die über eine gemeinsame Struktur und Funktionsweise verfügen und dadurch charakterisiert sind, dass sie durch kleine lipophile Moleküle reguliert werden können. Die Signaltransduktion durch diese Moleküle ist essentiell für die Physiologie und Entwicklung von Vertebraten. Im Gegensatz zu den membranständigen Rezeptoren sind sie löslich und können im Kern oder im Cytoplasma vorliegen. Die klassischen Kernrezeptoren sind die für endokrine Hormone wie Steroide und Thyroide, sowie für die parakrin wirkenden Retinoide, die ihre Liganden mit hoher Spezifität und Affinität binden und dadurch aktiviert werden. Inzwischen kennt man auch Kernrezeptoren, die Liganden mit geringerer Spezifität und Affinität binden (Forman et al., 1997; Kliewer et al., 1997; Benoit et al., 2004) und eher als Sensoren für Metaboliten dienen, als die Signale von Hormonen zu vermitteln (Francis et al., 2003). Für eine große Zahl von sogenannten Waisen-Rezeptoren ist hingegen noch kein Ligand bekannt. Neueste Studien weisen darauf hin, dass für einige dieser Rezeptoren Liganden eher als fest-gebundene strukturelle Kofaktoren statt als regulatorische Komponenten dienen. Einige sind mit leerer Bindungstasche konstitutiv aktiv (Greschik et al., 2002; Sablin et al., 2003), während andere, wie Nurrl, gar keine Bindungstasche besitzen (Wang et al., 2003). Für die Rezeptoren mit leerer Bindungstasche wird eine inhibitorische Wirkung möglicher Liganden diskutiert, ligandenunabhängige Faktoren könnten z.B. durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen reguliert werden.

Kernrezeptoren besitzen eine modulare Struktur aus eigenständigen Proteindomänen, wobei die zentral lokalisierte DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD) stark konserviert sind. Die DNA-Bindungsdomäne ist für die spezifische Erkennung der DNA-Bindungssequenzen sowie die Dimerisierung der Rezeptoren verantwortlich und enthält dazu zwei Zink-Finger Motive (Luisi et al., 1991). Die Kernrezeptoren binden an spezifische DNA Sequenzen in der Nähe der von ihnen regulierten Gene, die als „Hormone-responsive-Elements“ (HRE) bezeichnet werden und meist aus zwei Kopien einer Hexamersequenz bestehen, die in verschiedener Ausrichtung und in unterschiedlichem Abstand zueinander liegen können. Die Mehrzahl der Kernrezeptoren binden an das zugehörige HRE als Homo- oder Heterodimere. Für die transkriptionelle Aktivierung ihrer Zielgene besitzen die Kernrezeptoren zwei Regionen, die Aktivierungsfunktionen AF, die im N-terminalen Bereich (AF-1) bzw. innerhalb der LBD (AF-2) gelegen sind. Um die Bindung von Koaktivatoren, die die Aktivierung der

Zielgene vermitteln, an der LBD zu ermöglichen, muss die α -Helix am C-Terminus der LBD, die AF-2 Helix, in einer aktiven Form vorliegen. Bei den klassischen endokrinen und parakrinen Kernrezeptoren ist dafür die Bindung eines Liganden notwendig. Korepressoren binden an eine mit der Bindung der Koaktivatoren überlappenden Sequenz, was bei einer aktiven Konformation der AF-2 Helix verhindert wird.

3 Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) ist ein als Waisen-Rezeptor bekanntes Mitglied der Familie der Kernrezeptoren. Seine natürlichen Liganden sind endogene Fettsäuren, die jedoch eher als strukturelle Kofaktoren denn als regulatorische Liganden dienen (Dhe-Paganon et al., 2002; Benoit et al., 2004). Strukturuntersuchungen deuten darauf hin, dass die Stabilisierung der aktiven Form der AF-2 Helix, im Unterschied zu anderen Kernrezeptoren, bei HNF4 α in erster Linie durch die Bindung von Koaktivatoren erreicht wird (Duda et al., 2004). HNF4 α ist im Nukleus lokalisiert und liegt bereits in Lösung als Homodimer vor, eine Bildung von Heterodimeren konnte bisher nicht beobachtet werden. Es bindet an HREs die als direkte Wiederholungen angeordnet sind. Außer in der Leber wird HNF4 α in der Niere und dem Darm und in geringerem Ausmaß im Magen und im Pankreas exprimiert.

3.1 Struktur und Spleißformen des HNF4 α Genes

Das menschliche HNF4 α Gen umfaßt 13 Exons und etwa 75 kb, wobei ein zweiter Promotor, P2, 45 kb stromaufwärts des ersten Promotors liegt (Furuta et al., 1997; Thomas et al., 2001). Die Intron/Exon Struktur läßt auf neun verschiedene Spleißformen schließen, von denen sechs nachgewiesen sind (Sladek and Seidel, 2001; Torres-Padilla et al., 2001). HNF4 α ist evolutionär stark konserviert und besitzt, wie in Abbildung 1 gezeigt, den für Kernrezeptoren typischen modulären Aufbau. Neben der DNA-Bindungsdomäne (C), mit dem doppelten Zink-Finger Motiv, und der Ligandenbindungsdomäne (E), mit der Aktivierungsfunktion AF-2, verfügt HNF4 α über eine N-terminale A/B Domäne mit der Aktivierungsfunktion AF-1, eine flexible Gelenkdomäne (D) und eine C-terminale Repressionsdomäne (F), die seine Aktivität negativ modulieren kann (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997; Ruse, Jr. et al., 2002).

Im Vergleich mit der als erstes aus der Leber isolierten Isoform HNF4 α 1 (Costa et al., 1989), besitzt HNF4 α 2 eine Insertion von 10 Aminosäuren in der F-Domäne (Hata et al., 1992) und zeigt eine verstärkte Interaktion mit Koaktivatoren (Sladek et al., 1999).

HNF4 α 3 besitzt eine völlig andere F-Domäne (s. Abb.1) und ist in allen bisher analysierten Geweben in weit geringerer Menge vorhanden als die ersten beiden Formen (Kritis et al., 1996). Die Isoformen HNF4 α 4 bis HNF4 α 6 kombinieren die drei C-terminalen Varianten jeweils mit einer 50 Aminosäure Insertion in der A/B-Domäne im N-terminalen Bereich, wobei nur HNF4 α 4 bisher nachgewiesen ist (Drewes et al., 1996). Die Insertion konnte nur in der Leber detektiert werden (Furuta et al., 1997). Drei weitere Isoformen, HNF4 α 7 bis HNF4 α 9, ergeben sich durch eine Kombination der unterschiedlichen F-Domänen mit einer alternativen A/B-Domäne, die durch Transkription vom zweiten Promotor P2 entsteht (Thomas et al., 2001).

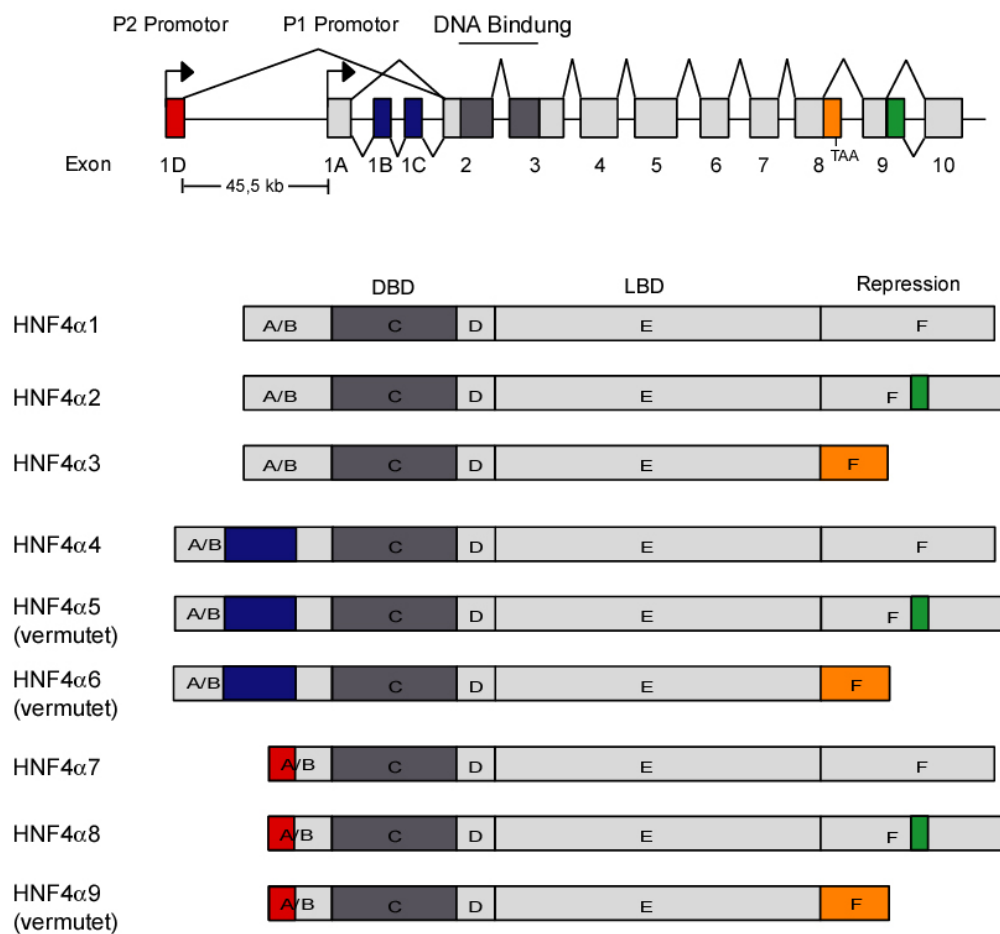


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur des menschlichen HNF4 α Gens und der möglichen Spleißformen (abgeändert nach Sladek und Seidel, 2001). DBD: DNA-Bindungsdomäne, LBD: Ligandenbindungsdomäne

Der P2-Promotor ist vor allem im Pankreas, aber auch in der Leber, jedoch nicht in der Niere aktiv (Nakhei et al., 1998; Thomas et al., 2001). Für die beiden bisher nachgewiesenen P2-Spleißformen HNF4 α 7 und HNF4 α 8 wurde in Leberzellen eine entwicklungsabhängige Expression gezeigt, wobei in der embryonalen Leber nur der P2 Promotor aktiv ist, während die P1-Transkripte HNF4 α 1/HNF4 α 2 erst ab der Geburt

zunehmen und im adulten Organismus die einzigen HNF4 α Formen darstellen (Torres-Padilla et al., 2001). Basierend auf Reportergenassays mit entwicklungsabhängig exprimierten Zielgenen von HNF4 α wird außerdem spekuliert, dass diese Isoformen ihrem Expressionsprofil entsprechend verschiedene Gene unterschiedlich stark aktivieren (Torres-Padilla et al., 2001). Die P2-Isoformen interagieren weniger stark mit Koaktivatoren wie CBP/p300 und GRIP-1, da ihnen die Aktivierungsfunktion AF-1, die an diesen Interaktionen beteiligt ist, fehlt (Torres-Padilla et al., 2002). Allerdings wurde HNF4 α 7 in Reportergenassays auch weniger stark durch den Korepressor SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptors) reprimiert (Torres-Padilla and Weiss, 2003). In den β -Zellen des Pankreas werden die P2-Isoformen exprimiert, ob sie allerdings die vorherrschende Form dort sind, ist umstritten (Thomas et al., 2001; Hansen et al., 2002; Eeckhoutte et al., 2003). Die Bedeutung beider Promotoren wird jedoch durch Diabetes assoziierte Mutationen deutlich, die sowohl im P1- (Price et al., 2000) als auch im P2-Promotor (Thomas et al., 2001; Hansen et al., 2002) gefunden wurden. Der P2-Promotor weist außerdem funktionelle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren HNF1 α , HNF1 β und PDX1 auf, die wie HNF4 α eine wichtige Rolle bei Entwicklung und Funktion der β -Zellen spielen (s. Kapitel I.4.2).

3.2 Funktion und Zielgene von HNF4 α

Mäuse mit einer homozygoten Inaktivierung des HNF4 α Genes zeigen, dass es eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung von Vertebraten spielt, denn diese Tiere sterben während der Gastrulation, aufgrund einer Fehlfunktion des visceralen Endoderms (Chen et al., 1994). Erhalten die HNF4 α -defizienten Embryonen durch tetraploide Komplementation ein HNF4 α exprimierendes viscerales Endoderm, verläuft die Gastrulation normal und die Tiere überleben bis E12 (Duncan et al., 1997; Li et al., 2000), was eine Untersuchung der Rolle von HNF4 α bei frühen Stadien der Hepatocyten Entwicklung erlaubte. So konnte gezeigt werden, dass HNF4 α für die ersten Entwicklungsstadien der Leber nicht unabdingbar ist, jedoch für die Differenzierung der Hepatocyten benötigt wird (Li et al., 2000). Der Einsatz des Cre-loxP Systems ermöglicht die zeit- und gewebespezifische Ausschaltung des HNF4 α Genes und erlaubt so die Untersuchung der Rolle von HNF4 α in der adulten Leber (Hayhurst et al., 2001; Parviz et al., 2002). Mäuse mit HNF4 α -defizienten Hepatocyten zeigen eine Störung des Lipid-Haushaltes und des Gallensäure-Transports (Hayhurst et al., 2001). HNF4 α ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Hepatocyten-Phänotyps bzw. kann diesen in

dedifferenzierten Zellen aktivieren (Spath and Weiss, 1997; Inoue et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor ist notwendig für Ausbildung und Erhalt der Leber-Architektur und ein Induktor für die Entstehung des Epithels, wobei die nachgewiesene Aktivierung der Expression von Zelladhäsions- und Zellverbindungsproteinen (zur Entstehung von „tight junctions“) eine Rolle spielen könnte (Chiba et al., 2003; Parviz et al., 2003). Die meisten Zielgene von HNF4 α sind bisher in Leberzellen nachgewiesen worden, überwiegend durch Reportergen Assays mit transienten Transfektionen. Sie umfassen Gene mit verschiedensten Funktionen z.B. im Metabolismus und Transport von Nährstoffen, bei der Blutgerinnung, der Immunantwort, der Detoxifikation von Fremdstoffen, dem Harnstoffzyklus und der Zelladhäsion und beinhalten auch andere Transkriptionsfaktoren wie HNF1 α (zusammengefasst in Sladek and Seidel 2001). In den β -Zellen des Pankreas reguliert HNF4 α die Expression von HNF1 α , Insulin und Genen, die an Transport und Metabolismus von Glukose und an der Kopplung von Metabolismus und Insulin-Sekretion beteiligt sind (Stoffel and Duncan, 1997; Wang et al., 2000; Bartoov-Shifman et al., 2002).

4 Diabetes mellitus

4.1 Diabetes mellitus und die β -Zellen des Pankreas

Die endokrinen Zellen des adulten Pankreas spielen eine entscheidende Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel. Sie sind in hoch vaskularisierten und enervierten Mikroorganen, den sogenannten Langerhansschen Inseln, im Pankreas verteilt, wobei sie nur etwa 2,5 % von dessen Gesamtgewicht ausmachen. Jede Insel enthält die vier Inselzelltypen: die Glucagon produzierenden α -Zellen, die Insulin produzierenden β -Zellen, die Somatostatin herstellenden δ -Zellen und die das Pankreatische-Polypeptid sekretierenden PP-Zellen. Die β -Zellen machen mit 60-80 % den größten Teil der Inselzellen aus. Sie sind die Glukosesensoren des Körpers und halten durch die regulierte Sekretion des Peptidhormons Insulin die Blutzucker-Konzentration des Körpers in engen physiologischen Grenzen. Insulin erhöht die Aufnahme von Glukose aus dem Blut durch Fett- und Muskelzellen und inhibiert die Glukose-Produktion in der Leber. Die Fehlfunktion von β -Zellen führt zu Diabetes mellitus, einer Krankheit, von der weltweit etwa 150 Millionen Menschen betroffen sind. Es gibt zwei Hauptformen von Diabetes mellitus. Bei Typ-1-Diabetes werden die β -Zellen durch Autoimmunprozesse und Entzündungsreaktionen zerstört, so dass der Körper kein Insulin mehr produzieren kann. Bei dieser Form von Diabetes ist die Einnahme von Insulin zum Überleben absolut notwendig. Typ-2-Diabetes, dass 90 % der weltweiten Fälle ausmacht, wird durch eine

gestörte Insulin-Sekretion in Kombination mit einer Insulin-Resistenz hervorgerufen, wobei die Gewichtung beider Faktoren unterschiedlich sein kann. Diese Form von Diabetes kann oft durch bestimmte Diäten oder die Einnahme von hypoglykämischen Präparaten behandelt werden. Veränderungen der Lebensbedingungen, vor allem mangelnde Bewegung und das gestiegene Vorkommen von Fettleibigkeit, haben im Laufe des letzten Jahrhunderts zu einer explosionsartigen Ausbreitung von Typ-2-Diabetes geführt, die weiter anhält. Trotz Behandlung der Diabetes Erkrankung führen die Sekundäreffekte des erhöhten Blutzuckerspiegels zu zahlreichen Sekundärleiden und einer verringerten Lebenserwartung der Betroffenen. Mikrovaskuläre Folgeerkrankungen können Blindheit, Nierenversagen und Nervenschäden hervorrufen. Diabetes assoziierte Atherosklerose erhöht das Risiko für Herzinfarkte und Schlaganfälle und führt zu einer Unterversorgung der äußeren Extremitäten, was deren Amputation zur Folge haben kann.

Die β -Zellpopulation ist dynamisch und die Zellen unterliegen einer kontinuierlichen Erneuerung mit einer Lebensdauer von etwa 60 Tagen (Bonner-Weir, 2000). Im Normfall gleichen sich Neogenese, Proliferation und Apoptose aus und die β -Zellmasse bleibt konstant bzw. kann sich physiologischen und metabolischen Bedingungen anpassen. Eine aktuelle Studie am Maus-Modell zeigt, dass neue β -Zellen unter normalen Bedingungen im adulten Pankreas, aber auch nach Pankreatomie, vorwiegend durch Selbst-Vervielfältigung anstatt durch Differenzierung von Stammzellen gebildet werden (Dor et al., 2004). Erhöhter Insulinbedarf in Folge von starkem Übergewicht und Insulin-Resistenz kann gewöhnlich durch erhöhte Insulin-Sekretion ausgeglichen werden (Polonsky, 2000). Im Maus-Modell führt Übergewichtigkeit gesunder Tiere auch zu einer kompensierenden Zunahme der β -Zellmasse (Flier et al., 2001) und es gibt Hinweise für diesen Mechanismus auch beim Menschen (Kloppel et al., 1985). Störungen von Neogenese und Proliferation der β -Zellen oder vermehrte Apoptose können zur Pathogenese von Diabetes beitragen. In allen Diabetes Maus-Modellen und auch in menschlichen Typ-2-Diabetes Patienten wurde eine signifikante Verringerung der β -Zellmasse festgestellt (zusammengefasst in Dickson and Rhodes, 2004), wobei einige Studien dies auf eine Zunahme der β -Zell-Apoptose zurückführen (Pick et al., 1998; Butler et al., 2003b; Butler et al., 2003a). Unklar ist, ob die Verringerung der β -Zellmasse durch Apoptose ursächlich für die Erkrankung sein kann, oder ob es sich um einen Sekundäreffekt handelt. Hyperglycaemie und Hyperlipidaemie, wie sie bei Diabetes mellitus auftreten, haben einen toxischen Einfluss auf die β -Zellen (Poitout and Robertson, 2002). Typ-2-Diabetes ist eine heterogene und multifaktorielle Erkrankung an deren Entstehung sowohl Umwelteinflüsse

als auch genetische Faktoren beteiligt sind. Es ist eine polygene Erkrankung, zu deren Entstehung Polymorphismen in zahlreichen Genen beitragen können, die an der Insulin-Sekretion und den Insulin-Signalwegen beteiligt sind (Stern, 2000). Die Arbeit mit Tiermodellen hat bereits zur Entdeckung einer Reihe von potentiellen Typ-2-Diabetes Suszeptibilitätsgenen geführt, ihre Rolle bei der Erkrankung des Menschen ist jedoch nur unzureichend bewiesen. Die begrenzte Zugänglichkeit menschlicher β -Zellen und die allgemeine Schwierigkeit, reine β -Zellen zu isolieren, sowie der ungewisse Einfluß verschiedenster Umweltfaktoren erschweren die umfassende Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Seltene monogene Formen von Diabetes können helfen, diese Probleme zu umgehen und können wichtige Hinweise für die genetischen Ursachen von β -Zell-Fehlfunktionen und Insulin-Resistenz liefern.

4.2 MODY

MODY (Maturity Onsset Diabetes of the Young) ist eine klinisch heterogene Gruppe von autosomal dominant vererbten Erkrankungen, die im Vergleich zu Typ-2-Diabetes etwa 2-5 % ausmachen. MODY ist charakterisiert durch eine Fehlfunktion der β -Zellen des Pankreas und einem frühen Ausbruch der Erkrankung im jungen Erwachsenenalter, gewöhnlich vor dem 25. Lebensjahr (Hattersley, 1998). Fünf der sechs bisher bekannten Formen verlaufen progressiv und werden von heterozygoten Mutationen in Genen von Transkriptionsfaktoren ausgelöst. Mutationen des für den zellspezifischen Transkriptionsfaktor HNF4 α kodierenden Genes führen zu MODY1, die weiteren MODY-assoziierten Transkriptionsfaktoren sind HNF1 α /TCF1 (MODY3), PDX1/IPF1 (MODY4), HNF1 β /TCF2 (MODY5) und NEUROD1/BETA2 (MODY6) (zusammengefasst in Servitja and Ferrer, 2004). Einzig MODY2 wird durch Mutationen in dem für das Enzym Glukokinase kodierenden Gen verursacht (Fajans et al., 2001). Glukokinase katalysiert den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse und funktioniert so als Glukosesensor der β -Zellen. Die mit MODY assoziierten Transkriptionsfaktoren sind wie in Abbildung 3 gezeigt in einem komplexen regulatorischen Netzwerk miteinander verknüpft, das keine lineare Hierarchie aufweist sondern aus kreuz- und autoregulatorischen Elementen besteht (Ferrer, 2002). Das Netzwerk reguliert die Expression von Insulin und Genen, die am Transport und Metabolismus von Glukose und am mitochondrialen Metabolismus beteiligt sind und ist essentiell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung des β -Zell Phänotyps.

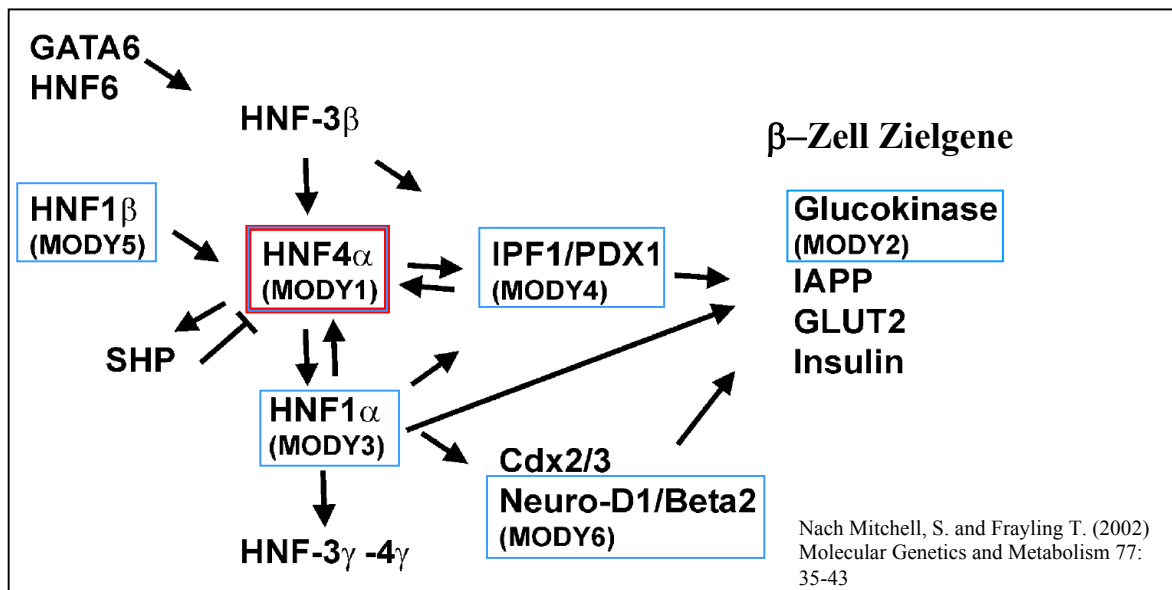


Abbildung 2: Transkriptionsfaktor-Netzwerk in β -Zellen. MODY-assoziierte Gene sind blau gerahmt.

MODY scheint ein Haploinsuffizienz-Mechanismus zugrunde zu liegen, da für HNF1 α und HNF4 α viele Studien einen dominant-negativen Effekt ausschließen und stattdessen auf Funktionsverminderungen hinweisen (Stoffel and Duncan, 1997; Vaxillaire et al., 1999; Lausen et al., 2000). Dafür sprechen auch MODY assoziierte Mutationen in Promotor-Regionen (Gagnoli et al., 1997; Thomas et al., 2001). Ein Beweis für diese Theorie wäre, wenn die komplette Deletion eines Allels ebenfalls zu MODY führen würde. Es scheint, dass sowohl HNF4 α als auch HNF1 α β -zellspezifische Funktionen haben, die für Dosis-Effekte empfindlich sind, da heterozygote Mutationen beim Menschen selektiv zu Fehlfunktionen der β -Zellen führen, während andere Gewebe keine oder nur geringe Veränderungen zeigen (Byrne et al., 1996; Froguel and Velho, 1999). Dagegen sind durch homozygote Mutationen zahlreiche andere Gewebe betroffen (Chen et al., 1994; Hayhurst et al., 2001; Shih et al., 2001). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Geweben Bestandteil unterschiedlicher regulatorischer Netzwerke sind. Eine Erklärung für die Empfindlichkeit des β -Zell-Transkriptionsfaktornetzwerkes für Haploinsuffizienz könnte die β -zellspezifische Regulation von HNF4 α durch HNF1 α sein. Während die positive Regulation von HNF1 α durch HNF4 α nicht zellspezifisch ist, wurde festgestellt, dass in β -Zellen, jedoch nicht in der Leber oder Niere, HNF1 α für die Expression von HNF4 α benötigt wird (Boj et al., 2001). Diese β -zellspezifische Regulation wird durch die HNF1-Bindestelle des P2 Promotors von HNF4 α direkt vermittelt (Boj et al., 2001). Ein solcher sich gegenseitig aufrechterhaltender Kreislauf kann eine Empfindlichkeit gegenüber relativ geringen Dosis-

Effekten verursachen (Laurent and Kellershohn, 1999; Smolen et al., 2000). Der Ausfall eines Allels eines der beiden Faktoren könnte dazu führen, dass nicht mehr genug Genprodukt zur Aktivierung der Expression des zweiten Faktors vorhanden ist. Oder ein Allel reicht aus, um die gegenseitige Aktivierung aufrecht zu erhalten, erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines transienten Abfalls des Genproduktes unter diesen Schwellenwert. Dieser transiente Auslöser kann ausreichen, um die gegenseitige Aktivierung zu beenden und somit beide Transkriptionsfaktoren völlig auszuschalten.

Für HNF4 α wird eine weitreichendere Rolle auch bei der allgemeinen Typ-2-Diabetes angenommen. Zwei aktuelle Studien weisen auf HNF4 α als mögliches Typ-2-Diabetes Suszeptibilitätsgen hin (Love-Gregory et al., 2003; Silander et al., 2004).

5 HNF4 α , ein Regulator des Zellwachstums in β -Zellen?

Obwohl einige Zielgene von HNF4 α in β -Zellen bekannt sind, deren Fehlfunktion für die gestörte Glukose-stimulierte Insulin-Expression in Patienten mit Diabetes zumindest teilweise verantwortlich sein könnten (Wang et al., 2000), erklärt dies nicht den späten Ausbruch und den progressiven Verlauf von MODY1. Lausen et al. vermuteten daher einen Einfluß von HNF4 α auf das Wachstum von β -Zellen (Lausen et al., 2000). Diese Annahme wurde durch die Beobachtung untermauert, dass die Expression von HNF4 α durch Einbringen eines Expressionsvektors das Aufwachsen stabiler Zellklone der Ratten Insulinoma Zelllinie INS-1 im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leervektor oder einem das LacZ Gen exprimierenden Vektor transfiziert wurden, hemmt. Einige MODY-assoziierte HNF4 α Mutanten wie R154X und Q268X hatten hingegen keinen reprimierenden Effekt, während andere, wie R127W oder E276Q, eine verringerte bzw. keine hemmende Wirkung auf das Aufwachsen der Klone zeigten. Um eine genauere Untersuchung des Effektes zu ermöglichen, wurden stabile INS-1 Klone etabliert, die die Induktion der Expression eines Transgens durch Flp-Rekombinase vermittelte Rekombination ermöglichten (Angrand et al., 1998). Die konstitutiv exprimierte Flp-Rekombinase ist dabei an die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert, die so modifiziert ist, dass sie nur künstliche Östrogen-Derivate, wie Tamoxifen, bindet. Nach Transfektion des Expressionssystems und Antibiotika-Selektion zeigte jedoch die Analyse der Einzelklone, dass nur in etwa 10 % der antibiotikaresistenten Klone das Transgen induzierbar war. Für die folgenden Experimente wurden Klone ausgesucht, in denen etwa 40 % der Zellen eine Induktion des Transgens zeigten. Nach Induktion der HNF4 α Expression in diesen Klonen konnte eine Abnahme der das Transgen exprimierenden Zellen mit der Zeit festgestellt

werden, während der Anteil von LacZ exprimierenden Zellen im entsprechenden Zeitraum stabil blieb. Auch die Induktion der Expression von verschiedenen MODY Mutanten führten nicht oder in geringerem Ausmaß zu einer Abnahme des Anteils exprimierender Zellen. Die Expression von HNF4 α führte auch zu einer Verringerung des Gesamtzellwachstums im Vergleich zu den entsprechenden nicht-induzierten Zellen, während dies bei Expression von LacZ oder R154X nicht der Fall war. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HNF4 α einen negativen Einfluß auf das Wachstum von β -Zellen hat. Dieser Einfluß ist spezifisch, da Kontrollen wie das LacZ Gen diese Effekte nicht zeigen. Dass auch natürlich vorkommende MODY Mutanten keine oder nur eine schwache Wirkung auf das Zellwachstum haben deutet darauf hin, dass diese Funktion bei der Erkrankung eine Rolle spielt. Da im Laufe der Zeit der Anteil der induzierbaren Zellen weiter abnahm, konnten sie für weiterführende Experimente nicht mehr verwendet werden.

6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von HNF4 α bei der Steuerung von Proliferation und Apoptose in der Ratten Insulinoma Zelllinie INS-1 zu charakterisieren. Zunächst sollte die HNF4 α -abhängige Hemmung des Wachstums der INS-1 Zellen, die in einer früheren Arbeit unserer Gruppe gefunden wurde (Lausen et al., 2000), in einem zweiten unabhängigen Expressionssystem überprüft werden. Dabei handelt es sich um bereits etablierte stabile INS-1 Zellklone, in denen die Expression von HNF4 α 1 bzw. einer dominant-negativen HNF4 α Mutante durch Zugabe des Tetracyclin-Derivates Doxycyclin induziert werden kann (Wang et al., 2000). Würde eine HNF4 α -abhängige Hemmung des Zellwachstums mit diesem zweiten System bestätigt, so sollte eingehender untersucht werden, ob diese Wachstumshemmung auf eine verminderte Proliferation, einen verstärkten Zelltod oder eine Kombination beider Mechanismen zurückzuführen ist. Für den Fall, dass sich eine Zunahme absterbender Zellen nachweisen lässt, sollte geklärt werden, ob es sich dabei um apoptotische oder nekrotische Zellen handelt. Dies ist entscheidend, da es einen Hinweis darauf gibt inwieweit HNF4 α über definierte molekulare Signalwege zum Zelltod führt oder unspezifisch cytotoxisch wirkt.

Die von dem alternativen Promotor P2 abgeleiteten Spleißformen von HNF4 α werden in β -Zellen stark exprimiert und spielen auch bei MODY1 eine wichtige Rolle (Boj et al., 2001; Thomas et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit HNF4 α 8 ebenfalls eine Isoform von HNF4 α untersucht werden, die vom P2 Promotor exprimiert wird. Gleichzeitig sollte für die weiteren Untersuchungen das neuartige T-REx Flp-In Expressionssystem

verwendet werden, dass gegenüber den beiden bereits erwähnten Systemen (Lausen et al., 2000; Wang et al., 2000), den entscheidenden Vorteil bietet, dass die Transgene durch Flp-Rekombinase vermittelte Rekombination an stets einen einzigen, identischen Genlocus eingeführt werden. Dies macht die anschließende Analyse von Einzelklonen überflüssig und führt zu einer stark verbesserten Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien. Neben den bereits erwähnten funktionellen Untersuchungen sollte in diesem neuen Expressionssystem mit Hilfe der Microarray Technologie nach neuen Zielgenen von HNF4 α gesucht und dabei die Expressionsprofile der P1 und P2 Isoformen verglichen werden. Dies sollte wichtige Anhaltspunkte dafür liefern, ob die Isoformen in β -Zellen getrennte Funktionen haben oder die gleiche Gruppe von Genen regulieren. Um die Verlässlichkeit der Methode festzustellen, sollten anschließend ausgewählte Zielgene aus der Microarray Analyse mittels einer unabhängigen Methode, der Real Time RT-PCR, überprüft werden. Von besonderem Interesse bei der Untersuchung der Zielgene sollten Kandidaten mit einer Verbindung zu Proliferation und Apoptose sein. Solche Kandidaten sollten auf ihren Einfluß auf das Wachstum von INS-1 Zellen hin untersucht werden, um festzustellen, ob sie die Effekte von HNF4 α vermitteln. Dazu sollten sie einerseits stabil und induzierbar in INS-1 Zellen exprimiert und andererseits ihre Expression durch den Einsatz von siRNA vermindert werden.

II MATERIAL UND METHODEN

Molekularbiologische Untersuchungen wie Restriktionsverdau, Gelelektrophoresen, Ligationen, Transformationen und die Anzucht von Bakterien erfolgten, soweit nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen (Sambrock et al., 1998). Die Herstellung kompetenter Bakterien (*E.coli* DH5 α) erfolgte mit der CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972). Die Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ oder des „QIAEXII Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden). Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (10-20 μ g) aus Bakterienkulturen erfolgte mit einer auf alkalischer Lyse beruhenden Methode (Sambrock et al., 1998) oder mittels des „QIAGEN Plasmid Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden). Große Mengen Plasmid-DNA (100-500 μ g) wurden mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) gewonnen. Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen (Institut für Humangenetik) durchgeführt.

1 Chemikalien, Puffer, Oligonukleotide und Enzyme

Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) und Serva (Heidelberg) bezogen. Falls nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer und Lösungen nach den Angaben in Sambrock et al. (1989) hergestellt. Oligonukleotide stammten von der Firma Life Technologies (Karlsruhe). Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

2 Antikörper

| <u>Spezifität</u> | <u>Bezeichnung</u> | <u>Firma</u> | <u>Beschreibung</u> | <u>Wirtsorganismus</u> |
|---|--------------------|--------------|----------------------------------|------------------------|
| Erstantikörper | | | | |
| Myc | 9E10 | | monoklonal | Maus |
| HNF4 (C-Terminus) | sc-6556 | Santa Cruz | polyklonal | Ziege |
| Insulin | | DAKO | Antiserum | Meerschweinchen |
| AIF (C-Terminus) | sc-9416 | Santa Cruz | polyklonal | Ziege |
| Zweitantikörper Peroxidase-gekoppelt | | | | |
| Maus | NXA931 | Amersham | HRP-gekoppelter Gesamtantikörper | Schaf |
| Ziege/Schaaf | A9452 | SIGMA | Immunoglobulin Antikörper | Maus |
| Zweitantikörper Cy3-gekoppelt | | | | |
| Maus | #415-166-166 | Dianova | F(ab') ₂ -Fragment | Ratte |
| Ziege | #305-166-045 | Dianova | F(ab') ₂ -Fragment | Kaninchen |
| Meerschweinchen | #706-166-148 | Dianova | F(ab') ₂ -Fragment | Esel |

3 Vektorkonstrukte

pcDNA5/FRT/TO Konstrukte

Der pcDNA5/FRT/TO Vektor wurde von Invitrogen erworben und die offenen Leserahmen der cDNA der zu untersuchenden Gene HNF4 α 2, HNF4 α 8, R154X, C106R, GFP, AIF und KAI1 wurde jeweils in die multiple Klonierungsstelle einkloniert. Abgesehen von GFP und AIF handelt es sich dabei um die humanen Sequenzen. **MyHNF4 α 2** und **myR154X** wurden als NotI-Fragmente aus dem pOP-mycHNF4 α 2 bzw. pOP-mycR154X Expressionsvektoren (Lausen et al., 2000) ausgeschnitten und in die NotI Schnittstelle des pcDNA5/FRT/TO Vektors eingefügt. Das vom P2-Promotor abgeleitete 5'-Ende von HNF4 α wurde mittels PCR aus cDNA amplifiziert, die aus RNA von HepG2-Zellen gewonnen worden war. Dazu wurden folgende Primer verwendet (Restriktionsstellen unterstrichen):

5'-Primer: 5'-CGGGGTACCCATGGTCAGCGTGAACGCG-3'

3'-Primer: 5'-CCGGCTAAATCTGCAGGAG-3'

Das PCR Produkt wurde mit KpnI und XhoI ausgeschnitten und mit dem resultierenden Fragment wurde das entsprechende vom P1-Promotor abgeleitete KpnI/XhoI Fragment in dem pOP-mycHNF4 α 2 Expressionsvektor (Lausen et al., 2000) ersetzt. Die so erzeugte **myHNF4 α 8** Sequenz wurde als NotI-Fragment in die NotI Schnittstelle des pcDNA5/FRT/TO Vektors eingefügt und durch Sequenzierung überprüft. Der Vektor pcDNA5/FRT/TO **myC106R** wurde von Belén Lucas zur Verfügung gestellt. Er wurde

durch ortsspezifische Mutagenese (Quick Change sitedirected mutagenesis kit, Stratagene) aus dem pcDNA5/FRT/TO mycHNF4 α 2 Vektor hergestellt. **GFP** wurde von Gülüzar Turan als HindIII/XhoI-Fragment aus pCSGFP2 (Ryffel and Lingott, 2000) ausgeschnitten und in die HindIII/XhoI Schnittstelle des pcDNA5/FRT/TO Vektors eingefügt.

KAI1-HA wurde als KpnI/NotI-Fragment aus einem **CD82-HA** Vektor (Schoenfeld et al., 2004) ausgeschnitten, der von Dr. Stefan Grimm zur Verfügung gestellt worden war, und in den KpnI/NotI geschnittenen pcDNA5/FRT/TO Vektor einkloniert.

EGFP fusioniertes **AIF** aus der Maus wurde mit PmeI aus einem pcDNA3.1+ Vektor (Loeffler et al., 2001), zur Verfügung gestellt von Prof. Guido Kroemer, herausgetrennt und in die PmeI Schnittstelle des pcDNA5/FRT/TO Vektors eingefügt.

FrmH4si Konstrukte

Der Vektor FrmH4si wurde von Sabine Senkel aus dem Vektor pcDNA5/FRT/TO HNF4 α 2 konstruiert. Dabei wurde die HindIII Schnittstelle aus der multiplen Klonierungsstelle entfernt und mit Hilfe eines Linkers eine MluI/HindIII Schnittstelle hinter dem CMV Promotor in entgegengesetzter Richtung eingefügt. Aus den von GenScript bezogenen siRNA Kassetten wurden die jeweiligen für eine siRNA kodierenden DNA Sequenzen, einschließlich des Promoters, als MluI/HindIII Fragment ausgeschnitten und in die MluI/HindIII Schnittstelle des FrmH4si Vektors eingefügt.

pCSFLPe

exprimiert Flp Rekombinase unter der Kontrolle des CMV Promotors (Werdien et al., 2001)

4 RNA Isolierung

Die Isolierung und Aufreinigung von RNA erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Wenn erforderlich wurde dabei ein DNase Verdau mit dem „RNase-Free DNase Kit“ (QIAGEN, Hilden) durchgeführt, oder die RNA wurde durch eine auf Phenol-Chloroform Behandlung beruhende Methode unter Verwendung der „RNAPureTM“ Lösung (PeqLab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

5 RT-PCR

Erststrang-Synthesen wurden mit dem SuperScriptTM II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Karlsruhe) oder mit dem Omniscript RTTM Kit (QIAGEN, Hilden) nach den

Angaben der Hersteller durchgeführt, wobei Zufallsprimer (random primer) eingesetzt wurden. Standardmäßig wurde dabei 1 µg RNA pro Ansatz verwendet.

6 PCR

PCR Reaktionen wurden unter Verwendung der GoldStar® DNA Polymerase von Eurogentech, Köln, nach folgendem Protokoll durchgeführt:

| Ansatz | | Programm | |
|--------------------------|------------------------|------------|-------|
| | | Temperatur | Zeit |
| 10xPCR Puffer | 5 µl | 94° C | 2 min |
| MgCl ₂ (25mM) | 4 µl | 94° C | 45 s |
| dNTPs (10mM) | 1 µl | * | 1 min |
| GoldStar Polymerase | 0,2 µl | 72° C | 1 min |
| Primer 1 (25 µM) | 1 µl | 72° C | 7 min |
| Primer 2 (25 µM) | 1 µl | 4° C | ∞ |
| DNA | 100 ng/1 µl RT-Produkt | | |
| H ₂ O | ad 50 µl | | |

30x

* Anlagerungstemperatur der jeweiligen Primer

7 Real time PCR

Real time PCR Reaktionen wurden unter Verwendung von TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG und genspezifischen TaqMan® Gene Expression Assays (Assay-on-demand™) von Applied Biosystems (Darmstadt) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

| Ansatz | | Programm | |
|------------------|-------------|------------|--------|
| | | Temperatur | Zeit |
| Assay-on-demand™ | 1 µl | 95° C | 10 min |
| Master Mix | 10 µl | 95° C | 15 s |
| RT Produkt | 0,25 - 1 µl | 60° C | 1 min |
| H ₂ O | ad 20 µl | 4° C | ∞ |

40x

Verwendet wurden 0,25 µl - 1 µl des wie unter II.5 beschrieben hergestellten RT Produktes, abhängig von der zu erwartenden Transkriptmenge des zu untersuchenden Genes. Zur Erstellung von Standardkurven wurden für jeden TaqMan Assay Verdünnungsreihen mit vier bis fünf Punkten vermessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Normalisierung wurde für jedes RT Produkt die 18S RNA Menge bestimmt. Die Messungen wurden mit dem GeneAmp 5700 Sequence Detection System von Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt.

TaqMan Genexpression Assays

| Gen | Assay Nr. |
|-------------------------|------------------|
| ngfr | Rn00561634_m1 |
| AIF | Rn00442540_m1 |
| KAI1 (Ratte) | Rn00582491_m1 |
| asgr1 | Rn00561634_m1 |
| Neuromedin B Rezeptor | Rn00562994_m1 |
| Alanyl(m)aminopeptidase | Rn00578763_m1 |
| Transthyretin | Rn00562124_m1 |
| humanes KAI1 | Hs00174463_1 |

8 Microarray Analysen

Die Microarray Analysen wurden im BioChip Labor des Universitätsklinikums Essen unter Leitung von PD Dr. Klein-Hitpass durchgeführt. Dabei wurde die Affymetrix GeneChip Plattform verwendet und Probenaufbereitung und Microarray Hybridisierung erfolgten nach einem Standard Protokoll, das an anderer Stelle im Detail beschrieben ist (Durig et al., 2003). Die RNA wurde mittels RNAPureTM Lösung (PeqLab, Erlangen) isoliert (s. Kapitel II.4) und anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) unter Integration eines DNase Verdaus mit dem „RNase-Free DNase Kit“ (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Diese RNA wurde dem BioChip Labor übergeben und dort in doppelsträngige cDNA umgeschrieben, wobei ein Oligo-Deoxythymidin-Primer, der eine T7 RNA Polymerase Bindestelle besitzt, für die Erststrangsynthese verwendet wurde. Die doppelsträngige cDNA diente als Ausgangsmaterial für die Synthese von biotinylierter cRNA durch in vitro Transkription. Die cRNA wurde aufgereinigt, fragmentiert und mit dem Affymetrix Microarray RAE230A hybridisiert (Affymetrix, Santa Clara). Die Arrays wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewaschen und gefärbt und in einem GeneArray scanner 2500 (Agilent, Palo Alto) gelesen. Die Auswertung der gewonnen Daten erfolgte mit der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software (MAS 5.0; statistischer Algorithmus), mit deren Hilfe jedem Probenstet ein Detektionsstatus (detection call) zugeordnet wird: Present (anwesend), Absent (abwesend) oder Marginal (grenzwertig). Paarweise Vergleiche der nicht-induzierten und induzierten Proben wurden mit Hilfe von MAS 5.0 durchgeführt, das die Signifikanz (p-Wert) jeder differentiellen Genexpression basierend auf einem Wilcoxon Test berechnet. Um die Anzahl falsch positiver Zielgene zu minimieren, wurden nur die Probenstets mit einbezogen, die mindestens einen Present Call in dem nicht-induziert/induziert Probenpaar hatten. Zusätzlich wurden mit Hilfe des Affymetrix Data Mining Tools 3.0 verschiedene Filter auf die Ergebnisse angewendet. Es wurden die Probenstets als Kandidaten für eine differentielle Regulation selektioniert, die in

beiden der analysierten Zelllinien ein Signal log ratio ≥ 1 oder ≤ -1 (entsprechend eine 2-fachen Hoch- oder Runterregulation) aufweisen. Oder es wurde ein strengerer Filter verwendet und die Probensets ausgewählt, die ein Signal log ratio $\geq 1,32$ und einen p-Wert $> 0,001$ oder ein Signal log ratio $\leq 1,32$ und einen p-Wert $< 0,999$ besitzen.

9 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Zelllinien wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert, in einem ml eiskaltem PBS aufgenommen und eine Minute bei 14.000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 50 μ l (6 cm Schale, konfluent) - 200 μ l (10 cm Schale, konfluent) eiskaltem RIPA Puffer aufgenommen und unter leichtem Schütteln 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden unerwünschte Zellkomponenten durch Ultrazentrifugation bei 50000 rpm für 2 min (2°C) sedimentiert und der Überstand sofort in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und aliquotiert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BIO RAD Protein Assay (BIO RAD, München) entsprechend den Angaben des Herstellers.

RIPA Puffer: 50 mM TrisHCL pH 7,2
 150 mM NaCl
 0,1 % SDS
 1 % Na-deoxycholat
 1 % Triton X100

vor Gebrauch frisch hinzufügen: 1 mM PMSF
 1 μ g/ml Leupeptin
 1 μ g/ml Pepstatin
 1 μ g/ml Aprotinin

10 Immunoblotanalyse

Für die Immunoblotanalyse (Western Blot) wurden Gesamtzellextrakte durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Sambrock et al., 1998) aufgetrennt und anschließend im Halbtrocken-Verfahren mit Hilfe des Semi-Dry Transfer Systems Trans-Blot Cell SD von BIO RAD (München) auf eine Nitrocellulose Membran (Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Die Membran wurde eine Stunde bei RT mit Blocking-Reagenz (Amersham, Braunschweig) inkubiert, um unspezifische

Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran 1,5 Stunden bei RT mit dem Erstantikörper in der angegebenen Verdünnung in PBS mit 0,1 % Tween-20 inkubiert, eine halbe Stunde in PBS mit 0,1 % Tween-20 gewaschen, wobei diese Waschlösung dreimal gewechselt wurde, und eine Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper bei RT in der angegebenen Verdünnung inkubiert. Es wurde wie zuvor gewaschen. Die Detektion erfolgte mit den ECL™ Western Blotting Detection Reagents von Amersham (Braunschweig) nach den Angaben des Herstellers.

| Erstantikörper | Verdünnung |
|------------------------|-------------------|
| anti-myc 9E10 | 1:5 |
| anti-HNF4 α | 1:100 |
| anti-AIF | 1:1000 |
| Zweitantikörper | |
| Schaaf anti-Maus | 1:5000 |
| Maus anti-Ziege/Schaaf | 1:50000 |

11 Zellkultur

Bei allen Versuchen, in denen mit Doxycyclin oder Tetracyclin induzierte und nicht-induzierte Zellen verglichen wurden, wurden die nicht-induzierten Proben mit den entsprechenden Volumina abs. Ethanol behandelt (Dox und Tet sind in abs. Ethanol gelöst).

11.1 Medien und Zelllinien

RPMI-1640 (Rosewell Park Memorial Institute, (Moore et al., 1967))

Standardzusätze:

- + 1 mM NaPyruvat
- + 10 mM Hepes
- + 10 % FCS
- + P/S (100 U/ml)
- + 2 mM L-Glutamin
- + 50 μ M Mercaptoethanol

Einfriermedium:

RPMI-1640 Medium mit Zusätzen für alle Zellen wie oben beschrieben

- + 10 % FCS (20 % FCS insgesamt)
- + 10 % DMSO

Alle verwendeten Zelllinien basieren auf der von einem Insulinoma der Ratte abgeleiteten Zelllinie INS-1 (Asfari et al., 1992).

| Zelllinie/Zellklon | Zusatz |
|---|---|
| INS-1 | - |
| WT-HNF4 α / DN-HNF4 α (Wang et al., 2000) | 150 μ g/ml G418, 100 μ g/ml Hygromycin B |
| INS-1 Flp-In T-REx 1-1.2 | 10 mg/ml Blasticidin, 100 mg/ml Zeocin |
| INS-1 Flp-In T-REx GOI | 10 mg/ml Blasticidin, 150 μ g/ml Hygromycin B |
| INS-1 Flp-In T-REx FrmH4si | 10 mg/ml Blasticidin, 150 μ g/ml Hygromycin B |

11.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit den aufgeführten Zusätzen bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und mit 7,4 % CO₂ kultiviert. Standardmäßig wurden sie einmal pro Woche im Verhältnis 1:8 passagiert. Zur Erhaltung der Zelllinien und stabilen Klone wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurde eine konfluente 10 cm Schale trypsiniert, die Zellen pelletiert, in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und als 0,5 ml Aliquots zunächst für einige Tage bei -70°C gelagert bevor sie in den flüssigen Stickstoff überstellt wurden.

Um in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37°C aufgetaut, unverzüglich in 8 ml vorgewärmtes Medium gegeben, pelletiert, in 10 ml frischem Medium aufgenommen und auf einer 10 cm Schale ausplattiert.

11.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 μ l suspendierte Zellen in die Neubauer Zählkammer gegeben. Es wurden die Zellen in den vier um das Linienkreuz angeordneten Quadrate gezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser ergibt mit 10⁴ multipliziert die Anzahl der Zellen/ml in der Suspension.

11.4 Transfektionen

Transfektionen der kultivierten Zelllinien erfolgten unter Verwendung des kationischen Transfektionsreagenzes Lipofectamine™ von Invitrogen (Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden am Vortag in Sechslach-Platten ausgesät, in Konzentration von 500.000 Zellen pro Loch. Am folgenden Tag wurde die zu transfizierende DNA mit OptiMem (Invitrogen) auf 100 μ l aufgefüllt und mit jeweils 100 μ l einer Lipofectamine : OptiMem Mischung im Verhältnis 1 : 17,5 bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in dieser Zeit mit 1,5 ml OptiMem equilibriert. Nach 15 min wurden zu der DNA-Lipofectamine Mischung 1300 μ l OptiMem gegeben und diese Lösung auf die Zellen gegeben, von denen

zuvor das OptiMem entfernt worden war. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Transfektionslösung gegen frisches Medium ausgetauscht.

11.5 Etablierung stabiler INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien

Zur Etablierung der stabilen Zelllinien aus der INS-1 Flp-In T-REx Stammzelllinie wurde eine Transfektion wie unter II.11.4 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz 0,8 µg des pcDNA5/FRT/T0 Vektors mit dem zu untersuchenden Gen (gene of interest, GOI) und 0,8 µg des Flp-Rekombinase Expressionsvektors pCSFLPe kotransfiziert. Es wurden jeweils Doppelansätze hergestellt. Vier Stunden nach der Transfektion wurden das Medium gewechselt und RPMI mit Standardzusätzen und 10 mg/ml Blasticidin zugegeben. Am vierten Tag nach der Transfektion wurde durch Zugabe von 150 mg/ml Hygromycin zum Medium mit der Selektion der Zellen mit eingebautem GOI begonnen.

12 Immunfluoreszenz Analysen

Es wurden 300.000 oder 500.000 Zellen pro Loch in nunc-Schalen oder 6-Loch Platten auf Deckgläser ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte gegebenenfalls die Induktion.

12.1 Standard Protokoll

Alle Schritte außer der Fixierung erfolgten unter leichtem Schwenken, um eine gleichmäßige Vermischung der Lösungen und Inkubation der Zellen zu gewährleisten.

Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, 2 x kurz mit PBS gewaschen und 1 ml Methanol auf die Zellen gegeben. Nach 10 min wurde das Methanol entfernt. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden sie eine Stunde bei 4°C mit 10 % Ziegen Serum in PBS inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Das Blockierungsreagenz wurde abgenommen und 500 µl des Erstantikörpers in 10 % Ziegen Serum/PBS zugegeben. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei RT. Dann wurde 15 min bei RT mit PBS gewaschen und dabei einmal die Lösung gewechselt. Es folgte die Inkubation mit dem in 10 % Ziegen Serum/PBS verdünnten Cy3-gekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde, bei 4°C, im Dunkeln. Es wurde 15 min mit einem Lösungswechsel im Dunkeln bei 4°C gewaschen und das Deckglas mit einem Tropfen VECTASHIELD® Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop analysiert.

12.2 Nachweis von Insulin

Bis zur Zugabe des Erstantikörpers werden die Zellen auf 4°C gehalten (auf Eis) und eiskalte Puffer und Lösungen verwendet.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit frisch angesetzten 4 % igen Paraformaldehyd 5 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit 0,25 % Triton X-100 in PBS inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und 10 % Ziegenserum/PBS eine Stunde zum Blockieren auf die Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem in 10 % Ziegenserum/PBS verdünnten Erstantikörper erfolgte über Nacht. Die Zellen wurden 15 Minuten mit PBS gewaschen wobei die Lösung einmal gewechselt wurde. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte wie im Standard-Protokoll beschrieben. Gewaschen wurde 45 min im Dunkeln bei 4°C, wobei die PBS-Lösung zweimal gewechselt wurde. Die weitere Analyse fand wie oben statt.

12.3 Nachweis der Mutante R154X

Zur Detektion dieser HNF4 α Mutante mit Hilfe des anti-Myc Antikörpers wurde eine Paraformaldehyd-Fixierung wie zum Nachweis von Insulin beschrieben durchgeführt. Alle weiteren Schritte erfolgten jedoch wie im Standard-Protokoll beschrieben.

12.4 Detektion mit dem anti-HNF4 α und anti-AIF Antikörper

Zum Nachweis von HNF4 α und AIF mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Triton X-100 30 min bei RT fixiert und anschließend mit eiskaltem abs. Ethanol 30 min bei 4°C permeabilisiert. Die Blockierung erfolgte 30 min bei RT mit einer Blockierungslösung (da der Antikörper aus der Ziege gewonnen wird kann nicht das Ziegenserum zur Sättigung verwendet werden). Mit dem in PBS verdünnten Erstantikörper wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde dreimal 5 min mit der Blockierungslösung bei RT gewaschen und anschließend der Zweitantikörper in dieser Lösung verdünnt bei 4°C im Dunkel eine Stunde mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde 15 min gewaschen, wobei die Blockierungslösung einmal gewechselt wurde. Vor der Aufgabe des Mounting Mediums wurden die Zellen einige Male mit PBS gewaschen, um die milchige Lösung zu entfernen.

| | |
|---------------------|----------------------|
| Blockierungslösung: | 5 % Magermilchpulver |
| | 6 % Glycin |
| | 0,1 % Triton X-100 |

12.5 Antikörper Verdünnungen

| Erstantikörper | Verdünnung |
|-----------------------|------------|
| anti-myc 9E10 | 1:4 |
| anti-HNF4 α | 1:100 |
| anti-Insulin | 1:100 |
| anti-AIF | 1:100 |
| Zweitantikörper | |
| Ratte anti-Maus | 1:200 |
| Kaninchen anti-Ziege | 1:200 |
| Esel anti-Meerschwein | 1:500 |

12.6 Vorbereitung der Deckgläser

Die Deckgläser wurden ein bis zwei Stunden in 20 % Ethanol und 3 % Eisessig gelegt, mit abs. Ethanol abgespült und auf fuselfreien Papiertüchern einzeln getrocknet. Schließlich wurden sie zwei Stunden bei 200°C sterilisiert.

13 Ölrot O Färbung

Zur Anfärbung der neutralen Lipide im Cytoplasma wurden die in nunc Schalen auf Deckgläsern ausgesäten Zellen 1x mit PBS gewaschen, auf Eis gestellt und mit 4 % eiskaltem Formaldehyd 15 min fixiert (Koopman et al., 2001). Nach Absaugen des Formaldehyds wurde 3x mit dest. H₂O gewaschen und anschließend 30 min bei RT unter leichtem Schwenken mit 1 ml Ölrot O Arbeitslösung inkubiert. Die Ölrot O Lösung wurde abgenommen und die Schalen ausgiebig mit H₂O gewaschen. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen 10 % Glycerol in PBS auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop analysiert.

Ölrot O Stammlösung: 500 mg Ölrot O + 100 ml 60 % Triethylphosphat

Ölrot O Arbeitslösung: 36 % ige Ölrot O Stammlösung in dest. H₂O, gefiltert

14 MTS Assay

Relative Zellzahlen wurden mit dem CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega (Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Dazu wurden 32.000 Zellen/cm² (10.000 Zellen/Loch) in einer 96-Loch Platte ausgesät. Zur Messung wurden 20 μ l der AQueous One Lösung zu jedem Ansatz gegeben, die Zellen vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend im Photometer (Model 550 Microplate Reader, BIO RAD) vermessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

15 Luciferase Assay

Zur Detektion der Luciferase Aktivität wurden die Zellen in den 6-Loch Platten 3 mal mit PBS gewaschen, 5 min mit 50 µl Lysereagenz inkubiert, mit Hilfe eines Gummispatels abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und 20 µl davon mit 600 µl Luciferase-Reagenz (Luciferase Assay System, Promega) versetzt im Luminometer vermessen (Lumat LB9501, Berthold).

5 x Lysereagenz: 125 mM Trisphosphat
 10 mM DTT
 10 mM CDTA
 50 % Glycerin
 5 % Triton

16 Caspase 3/7 Assay

Caspase 3/7 Aktivität wurde mit Hilfe des Caspase-Glo™ 3/7 Assays von Promega (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers gemessen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 32.000 Zellen/cm² in weiß-wandige 96-Loch Platten ausgesät. Vor der Messung in einem Luminometer (GENios multimode research reader, Tecan) wurden die Zellen eine Stunde mit dem Caspase-Glo Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

17 DNA-Leiter Assay

Zum Nachweis der DNA Fragmentierung wurden Zellen trypsiniert, pelletiert und mit Lysepuffer über Nacht bei 37°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit 0,5 µg/µl RNase A eine Stunde bei 37°C verdaut und zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen abs. Ethanol über Nacht gefällt und durch Gelelektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert.

Lysepuffer: 50 mM Tris, pH 7,8
 10 mM EDTA
 1 % SDS
 0,5 mg/ml Proteinase K

18 Durchflußzytometrische Methoden

Durchflußzytometrische Versuche wurden mit einem FACS VantageTM Fluorescence Activated Cell Sorter von Becton Dickinson (Heidelberg), mit Unterstützung von Klaus Lennartz, durchgeführt und mit Hilfe der Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

18.1 BrdU Assay

BrdU-Inkorporationsexperimente wurden mit dem In Situ Cell Proliferation Kit FLUOS (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es wurden 4,6 mio Zellen (Messung nach 2 Tagen Induktion) oder 3,5 mio Zellen (Messung nach 4 Tagen) in 10 cm Schalen ausgesät und am folgenden Tag induziert. Nach der gewünschten Induktionszeit wurden die Zellen eine Stunde mit dem BrdU Markierungs-Reagenz im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert, pelletiert, in PBS aufgenommen und mit eiskaltem 50 mM Glycin (pH 2) und abs. Ethanol im Verhältnis 3:7 fixiert (30 min bei 4°C). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und zur Denaturierung der DNA 10 - 20 min bei RT mit 4 M HCl inkubiert. Die Zellen wurden 3 - 4 mal mit PBS gewaschen, bis der pH des Überstandes über 6,5 lag. Dann wurde 10 min bei RT mit Inkubationspuffer und anschließend 45 min im Brutschrank mit dem BrdU-Antikörper inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS bevor die markierten Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und im Zell-Sortierer vermessen wurden.

18.2 Propidium-Iodid Färbung

Für die Zellzyklus-Analyse mit Propidium-Iodid wurden 1,5 mio Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und am folgenden Tag induziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert, mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 70 % igem Ethanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS mit 10 µg/ml Propidium-Iodid und 50 µg/ml RNase aufgenommen und im Zell-Sortierer vermessen.

19 siRNA

Für die Versuche zur Repression der Genexpression wurden siRNA Kassetten von GenScript bezogen, die aus einem Promotor und einer Terminierungssequenz bestehen, die DNA einrahmen, die für eine Haarnadel-RNA kodiert. Diese DNA setzt sich aus der siRNA Sequenz, einer Schleifen-Sequenz und der siRNA Sequenz in umgekehrter Richtung zusammen.

| Name | siRNA Sequenz |
|--------|------------------------|
| luc | CTTACGCTGAGTACTTCGA |
| kai1 a | TGCTGATTCTTATAGCACAGG |
| kai1 b | GTCCATATGTTTGTGCCGGTA |
| kai1 c | TGTGGATTCTTGCAGACAAGA |
| kai1 d | TGCTCAAGAACTCTACCAAGA* |
| kai1 e | TGCTCAAGAACTCTACCAAGA |
| aif b | TGGAACGTCTTTAACCGAATG |
| aif c | GCTGCATGCTTCTATGATATA |
| aif d | CGGCAAAGGTGTCATCTTCTA |

* eine Punktmutation in der Schleifen-Sequenz, ein T fehlt

III ERGEBNISSE

1 Die Doxycyclin-induzierte Expression von HNF4 α hemmt von INS-r3 Zellen

1.1 Stabile von INS-1 Zellen abgeleitete INS-r3 Zellklone exprimieren induzierbar HNF4 α und eine dominant-negative Mutante

Um den Einfluß von HNF4 α auf das Wachstum von INS-1 Zellen zu untersuchen, wurden zunächst bereits etablierte stabile INS-1 Zellklone verwendet, die HNF4 α 1 aus der Ratte (WT-HNF4 α) bzw. eine dominant-negative HNF4 α Mutante, der die ersten 111 Aminosäuren fehlen (DN-HNF4 α), konditionell exprimieren (Wang et al., 2000). Diese Zellklone basieren auf dem stabilen INS-1 Zellklon INS-r3 (Wang and Iynedjian, 1997), der den reversen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (Gossen et al., 1995) exprimiert. Dabei ist das Tetracyclin-Derivat Doxycyclin der wirksamste Induktor (G). Die Zugabe von 500 ng/ml Doxycyclin führt bei beiden Zellklonen zu einer Induktion der Transgenexpression in über 90 % der Zellen (Abb. 3). In der Immunfluoreszenz ist außerdem die nukleare Lokalisation des HNF4 α Proteins zu erkennen, während sich die Mutante im Cytoplasma befindet. Dies deutet darauf hin, dass sich eine nukleare Lokalisierungssequenz (NLS) innerhalb der 111 fehlenden Aminosäuren befindet.

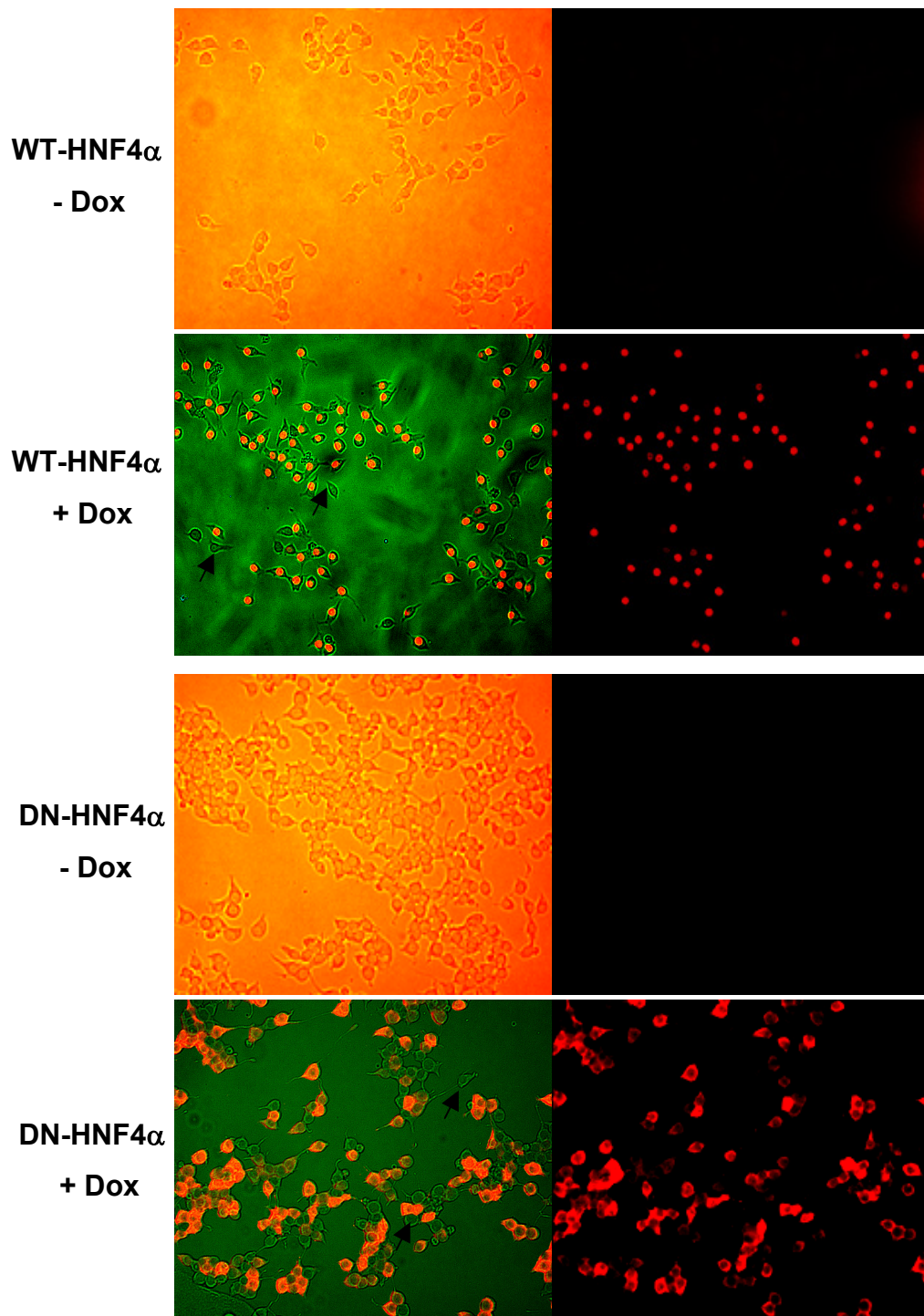


Abbildung 3: Induktion der INS-r3 Klone. Die Zellklone WT-HNF4 α und DN-HNF4 α wurden nicht behandelt (-), bzw. durch Zugabe von 500 ng/ml Doxycyclin induziert (+). Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit einem anti-HNF4 α Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. In der linken Spalte sind Phasenkontrast-Bilder der Zellen (gelb) oder Überlagerungs-Bilder der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahmen zu sehen (grün). Rechts sind die entsprechenden Fluoreszenz-Bilder gezeigt. Beispiele für Zellen, die das Transgen nach Induktion nicht exprimieren, sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

1.2 Die induzierte Expression von HNF4 α hemmt das Zellwachstum der INS-1 Zellen

Um die Wirkung von HNF4 α auf das Zellwachstum festzustellen, wurden 4 und 7 Tage nach Induktion mit Doxycyclin MTS Assays mit den Zellklonen WT-HNF4 α und DN-HNF4 α durchgeführt. Dabei wird photometrisch ein farbiges Formazan-Produkt gemessen, das von den Zellen aus der MTS Tetrazolium Verbindung gebildet wird. Die gemessene Absorption ist dabei direkt proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Wie in Abbildung 4 dargestellt, ergab sich für WT-HNF4 α nach 4 bzw. 7 Tagen Induktion eine Verringerung auf 45 % bzw. 9 % im Verhältnis zu den entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Auch die Zelllinie DN-HNF4 α zeigte nach Induktion ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zu entsprechenden nicht behandelten Zellen, auf 87 % nach 4 und 59 % nach 7 Tagen.

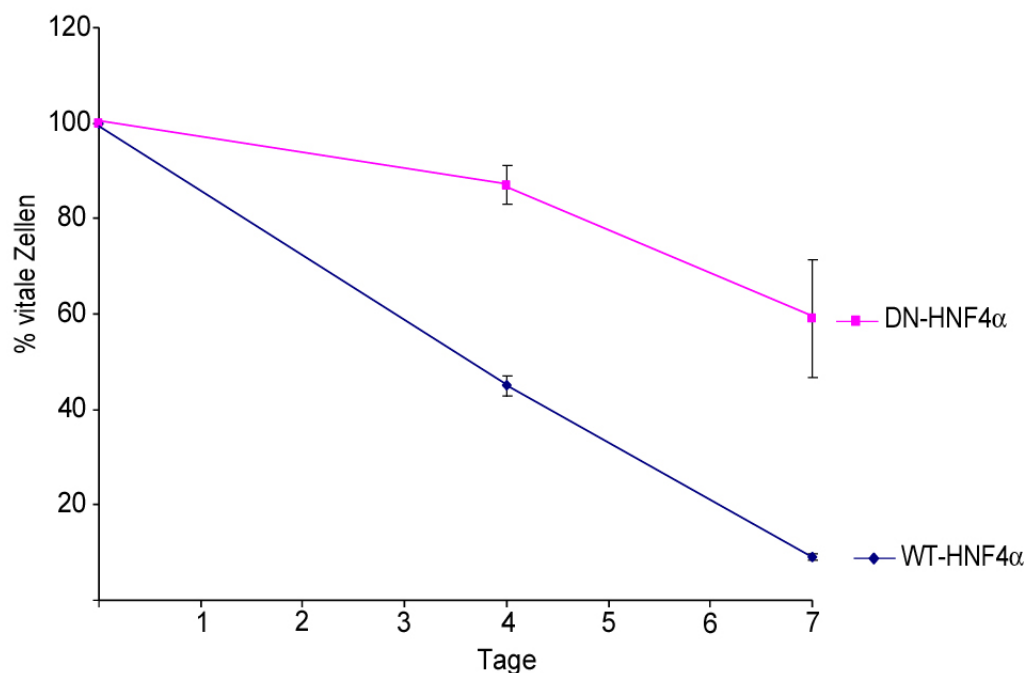


Abbildung 4: MTS Assay der INS-r3 Klone. Zellen des WT-HNF4 α und des DN-HNF4 α Klones wurden 4 bzw. 7 Tage mit 500 ng/ml Doxycyclin induziert. Die angegebenen Prozente beziehen sich auf die entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Werten an.

1.3 Nachweis des Insulingehaltes der INS-r3 Zellklone

Um die Qualität der INS-1 Zelllinien als β -Zell-Modell zu überprüfen, wurde Insulin immunologisch detektiert. Dabei stellte sich heraus, dass das Insulin-Signal bei den WT-HNF4 α und DN-HNF4 α Zellen weit schwächer ist als bei der INS-1 Ausgangszelllinie (Abb. 5). Während die Mehrzahl der INS-1 Zellen Insulin-positiv ist, ist bei den beiden stabilen Zelllinien kein Signal zu erkennen. Erst nach Verlängerung der Integrationszeit

von 260 s auf 1700 s ist bei einzelnen Zellen Insulin zu detektieren. Die INS-r3 Klone haben somit ein wichtiges Merkmal, das die INS-1 Zellen als β -Zell-Modell auszeichnet, verloren, da die große Mehrzahl der Zellen kein Insulin produziert.

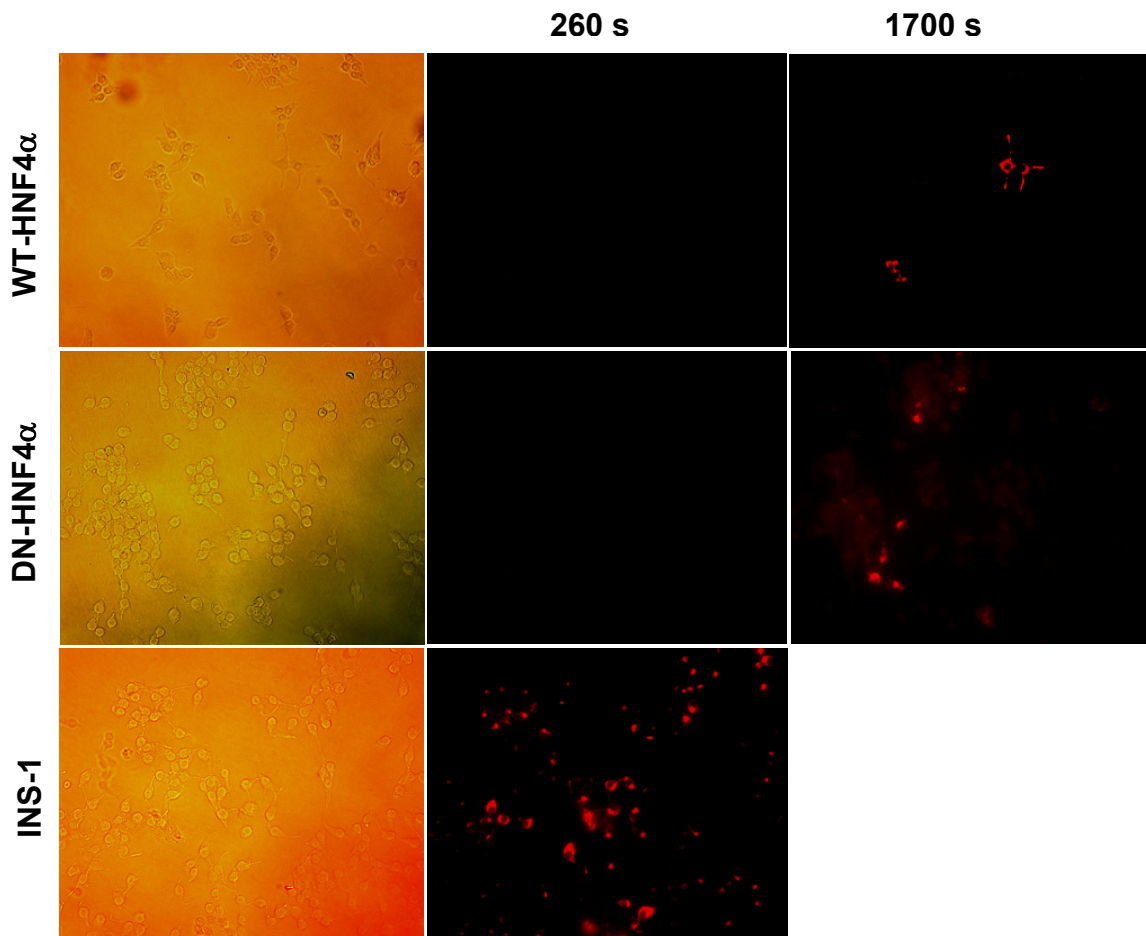


Abbildung 5: Insulin Nachweis in INS-r3 Zellklonen und INS-1 Zellen. Die Zellen der stabilen INS-r3 Zellklone WT-HNF4 α und DN-HNF4 α sowie der Zelllinie INS-1 wurden fixiert und mit einem anti-Insulin Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. Die linke Spalte zeigt Phasenkontrastaufnahmen und die mittlere und rechte Spalte zeigen Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Zellen mit 260 s bzw. 1700 s Integrationszeit.

2 Etablierung von INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien zur konditionellen Expression von HNF4 α Derivaten

Für eine von dem alternativen Promotor P2 abgeleitete Isoform von HNF4 α wurde in Reportergerätenversuchen in Hepatocyten ein abweichendes Transaktivierungsverhalten festgestellt (Torres-Padilla et al., 2001). Daher sollte in den β -Zellen ebenfalls eine P2-Isoform untersucht und mit der von dem ursprünglichen Promotor P1 abgeleiteten Spleißform verglichen werden.

Zur Untersuchung der Funktion von Transkriptionsfaktoren in β -Zellen, wurde in unserem Labor das Flp-In T-REx Expressionssystem von Invitrogen für INS-1 Zellen erfolgreich etabliert (Thomas et al., 2004). Dabei wurden INS-1 Flp-In T-REx Ausgangsklone

hergestellt, die die ortsspezifische Integration eines interessierenden Genes (GOI, gene of interest) durch Flp-Rekombinase vermittelte Rekombination erlauben, da sie einen einzelnen FRT Locus in ihr Genom integriert haben (s. Abb. 6). Die Stammzellklone haben außerdem den Tet-Repressor stabil eingebaut, was die Tetracyclin-abhängige Induktion des Transgens ermöglicht (Abb. 6). Alle eingeführten Konstrukte werden als Einzelkopie am selben chromosomalen Locus integriert. Unterschiede der transfizierten Zellen durch den Einbau unterschiedlicher Kopienzahlen an unterschiedlich aktiven chromosomalen Loci, die bei Standard-Transfektionen auftreten und dazu führen, dass einzelne Zellklone selektioniert, aufgezogen und analysiert werden müssen, um eine reine Population mit den gewünschten Eigenschaften zu erhalten, entfallen bei diesem System. Daher erlauben diese Stammzellklone die besonders schnelle und einfache Etablierung stabiler INS-1 Zelllinien mit konditioneller Expression eines gewünschten Genes mit dem zusätzlichen Vorteil, dass diese Zelllinien deutlich besser vergleichbar sind, als mit herkömmlichen Methoden etablierte stabile Zellklone.

Aufgrund dieser Vorteile und der mangelnden Insulin-Produktion der INS-r3 Klone wurde der Stammzellklon Flp-In T-REx 1-1.2 (Thomas et al., 2004) zur Etablierung stabiler INS-1 Zelllinien zur konditionellen Expression von verschiedenen HNF4 α -Derivaten verwendet. Dieser Zellklon weist eine niedrige HNF4 α Expression und den ausgeprägtesten β -Zell-Phänotyp auf, da er eine hohe Insulin 1 und 2 und eine relativ niedrige Glukagon Expression im Vergleich zu der INS-1 Ausgangszelllinie zeigt (Thomas et al., 2004).

Die cDNA-Konstrukte der zu untersuchenden Gene wurden in den pcDNA5/FRT/TO Vektor eingefügt (s. „gene of interest“ Abb. 6) und dieser dann mit dem Flp-Rekombinase Expressionsvektor pCSFLPe1 in die Flp-In T-REx 1-1.2 Zellen kotransfiziert (s. Abb. 6). Die Zellen, die das Konstrukt Rekombinase-vermittelt am FRT Locus integriert haben, wurden durch Zugabe von Hygromycin selektioniert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene HNF4 α Derivate, die in Abbildung 7 gezeigt sind, sowie GFP als Kontrolle, in die Flp-In T-REx 1-1.2 Zellen eingebracht.

Die beiden HNF4 α Isoformen HNF4 α 2 und HNF4 α 8 sind vom P1 bzw. P2-Promotor abgeleitet (Thomas et al., 2001) und unterscheiden sich in der N-terminalen Region (Nakhei et al., 1998). Die natürlich vorkommende MODY-Mutante R154X besteht aus einem verkürzten HNF4 α Protein (Lindner et al., 1997), das eine verringerte Transkriptionsaktivität aufweist (Laine et al., 2000; Lausen et al., 2000), während bei der künstlichen dominant-negativen Mutante C106R nur eine Aminosäure im Zink-Finger

Motiv ausgetauscht ist, wodurch die DNA-Bindungsfähigkeit zerstört wird (Taylor et al., 1996). Alle HNF4 α Derivate besitzen ein N-terminales Myc-Tag zur immunochemischen

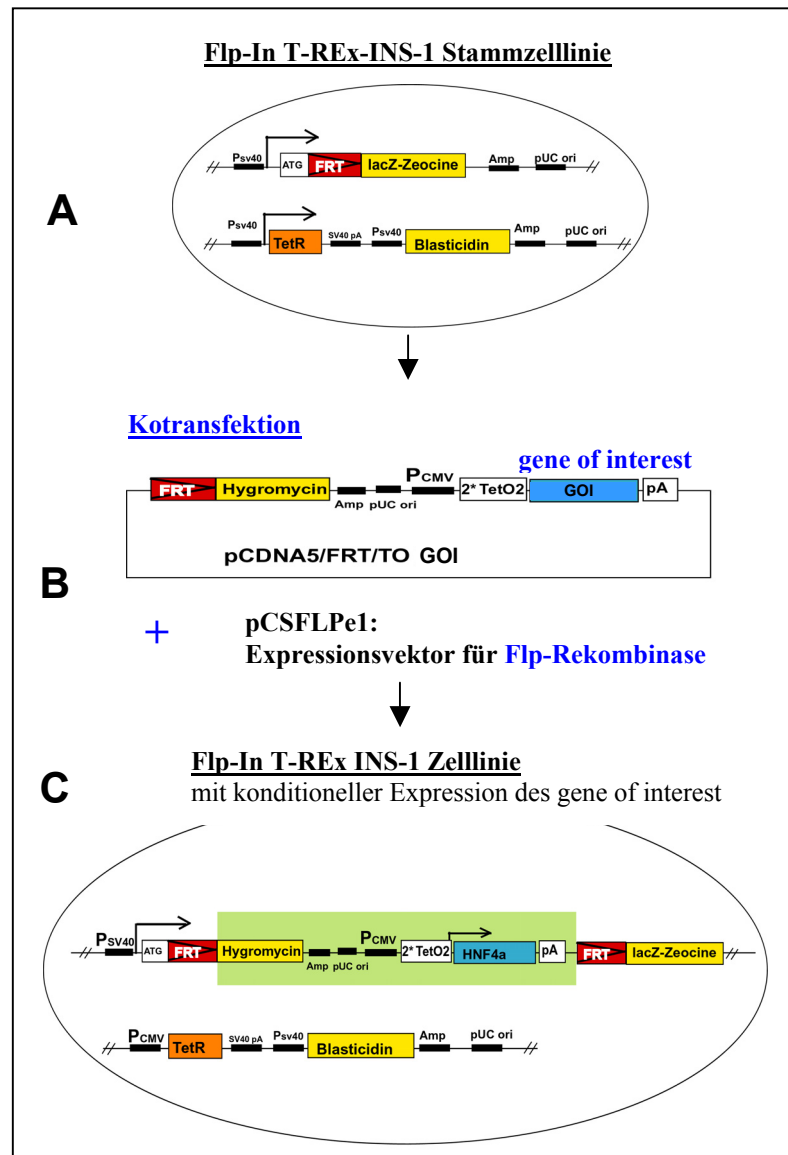


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herstellung der Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien. A) Die Flp-In T-REx INS-1 Ausgangszelllinie enthält eine einzelne in das Genom integrierte FRT Sequenz und exprimiert konstitutiv den Tet-Repressor. B) Die Ausgangszelllinie wird kotransfiziert mit dem pcDNA5/FRT/TO Vektor, der das zu untersuchende Gen (gene of interest) und eine FRT Sequenz enthält, und einem Expressionsvektor für die Flp-Rekombinase. C) Die Flp-Rekombinase vermittelt den Einbau des pcDNA5/FRT/TO Vektors an den FRT Locus. Die Selektionsmarker sind als gelbe Balken dargestellt.

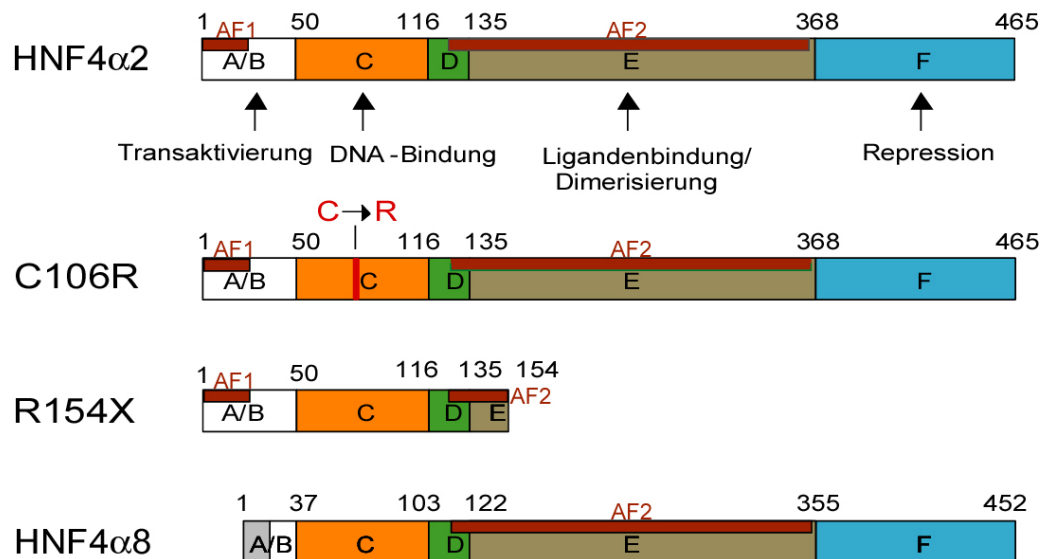


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Proteine, für die induzierbare Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien etabliert wurden. Die Domänen (A-F) und Aktivierungsfunktionen (AF) sind gezeigt. Für die HNF4α Mutante C106R ist der Aminosäureaustausch von C zu R an Position 106 gekennzeichnet. HNF4α8 weist eine alternative A/B Domäne auf. Die MODY Mutante R154X ist ein verkürztes HNF4α Protein, das nur die ersten 154 Aminosäuren umfaßt.

Detektion des Transgens. Es wurden jeweils 2 unabhängige stabile Zelllinien für jedes Konstrukt etabliert und im Folgenden als #1 und #2 bezeichnet.

Immunfluoreszenzanalysen zeigen für alle Zelllinien nach Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin eine Induktion der Transgenexpression in etwa 90 % der Zellen, mit einer nuklearen Lokalisation des Proteins (exemplarische Darstellung jeweils einer Zelllinie pro Konstrukt in Abb. 8). Bei ca. 3 % der nicht-induzierten Zellen konnte ebenfalls eine Expression des Transgens detektiert werden. Auszählen der fluoreszierenden Zellen der GFP-Zelllinien nach Tetracyclin-Behandlung ergibt eine Induktion von etwa 60 % der Zellen.

Eine Zeitreihe für die Zelllinie HNF4α2#2 zeigt, dass die maximale Induktion bereits nach 6 Stunden erreicht und der Anteil induzierbarer Zellen auch nach 72 Stunden unverändert hoch ist (Abb. 9). Eine Immunoblot Analyse von Gesamtzellextrakten zeigt die Induktion vergleichbarer Proteinmengen in allen HNF4α-Derivat-Zelllinien mit Ausnahme der beiden R154X exprimierenden, bei denen die Proteinmenge etwas geringer ist (Abb. 10A). Außerdem wurde am Beispiel von HNF4α2#1 und der beiden HNF4α8 exprimierenden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Induktion gezeigt (Abb. 10B). Eine schwache Bande bei der nicht induzierten Probe zeigt eine geringe basale Aktivität des Transgens bei fehlender Tetracyclin Zugabe. Da dem Western Blot zufolge, mit Ausnahme von HNF4α8#1, die maximale Expression bereits bei Zugabe von 50 ng/ml Tetracyclin erreicht ist, wurde diese Konzentration bei allen weiteren Versuchen verwendet.

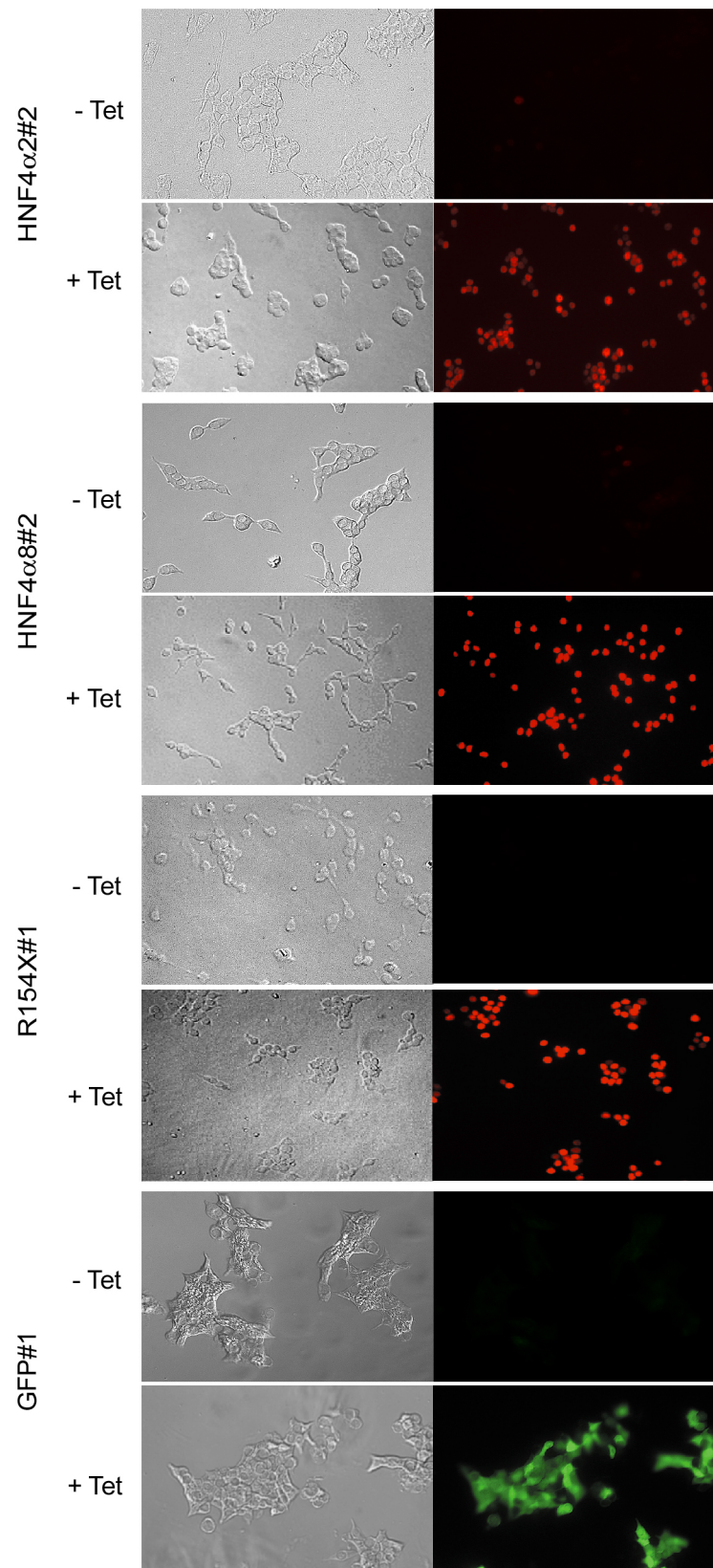


Abbildung 8: Immunfluoreszenzanalyse der Induktion der Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien. Die Zellen wurden nach 24 Stunden ohne (-Tet) oder mit Tetracyclin-Induktion von 1 μ g/ml Tetracyclin (+Tet) fixiert und mit einem anti-myc Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. Nicht-induzierte und induzierte GFP#1 Zellen wurden unbehandelt aufgenommen. Die linke Spalte zeigt die Phasenkontrastbilder und die rechte die Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Zellen bei einer Integrationszeit von 260s.

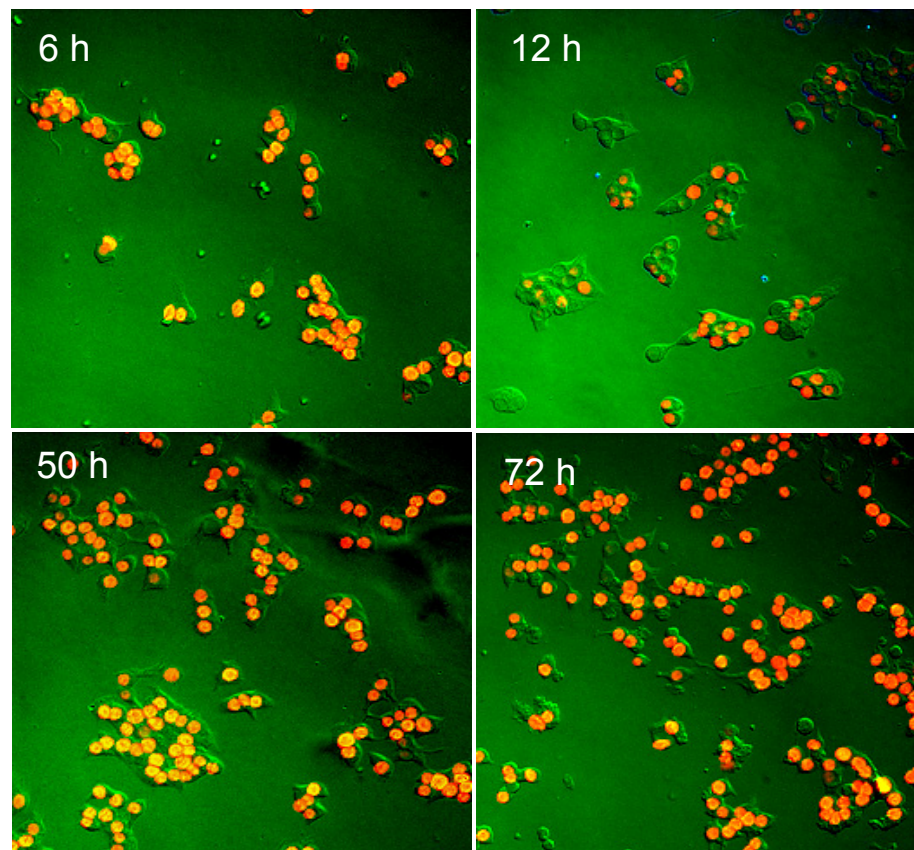


Abbildung 9: Immunfluoreszenz des zeitlichen Verlaufes der Transgenexpression in der Zelllinie Flp-In T-REx INS-1 HNF4 α #2. Dargestellt sind Überlagerungs-Bilder der Phasenkontrastaufnahme und der entsprechenden Fluoreszenzaufnahme. Die Markierung des Transgen-Produktes erfolgte mittels des anti-myc Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten Zweitantikörpers.

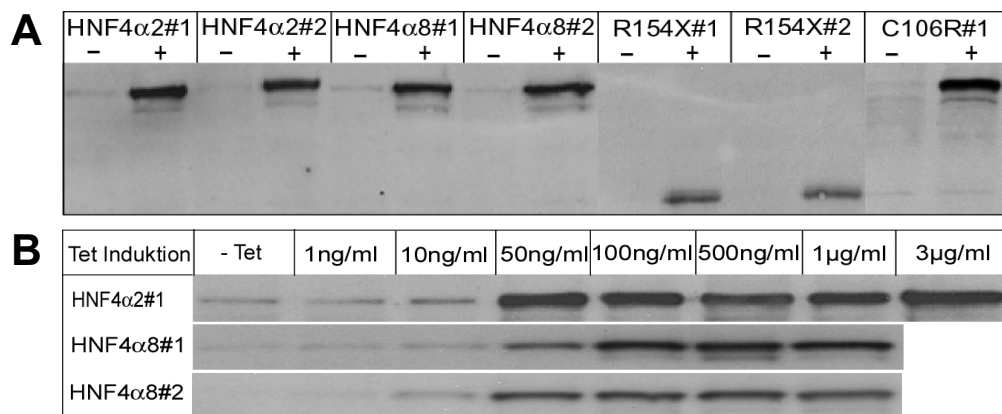


Abbildung 10: Immunoblot-Analyse der Induktion der INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien zur Expression von HNF4 α Derivaten. A) Analyse von Gesamtzellextrakten nicht-induzierter (-) und 24 Stunden mit 50 ng/ml Tetracyclin induzierter (+) Zellen. Verwendet wurde ein anti-myc Antikörper und eine Gesamtproteinmenge von 5 μ g. B) Tetracyclinabhängige Transgenexpression der Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien HNF4 α 2#1, HNF4 α 8#1 und HNF4 α 8#2. Die Zellen wurden mit keinem (-Tet) bzw. den angegebenen Tetracyclinkonzentrationen für 24 Stunden behandelt. Gesamtzellextrakte mit 5 μ g Gesamtprotein wurden aufgetragen und die Detektion erfolgte mit dem anti-myc Antikörper.

3 Die Expression von HNF4 α führt zu morphologischen Veränderungen von INS-1 Zellen

Zwei Tage nach Tetracyclin-Induktion der HNF4 α 2 Expression kommt es zu einer auffälligen Veränderung der Morphologie der INS-1 Zellen (Abb. 11). Sie wirken platt, dunkel und nehmen polygonale Formen an. Es tritt starke Vakuolisierung auf und nach drei Tagen sind zahlreiche tote Zellen und Zelltrümmer sichtbar. Die Expression der Isoform HNF4 α 8 hingegen verursacht völlig andere morphologische Veränderungen. Hier vereinzeln die Zellen zwei Tage nach Induktion stark. Nach drei Tagen bestehen kaum noch Zell-Zell-Kontakte und die Zellen wirken kleiner. Es sind auch einige tote Zellen sichtbar, jedoch nicht in einem mit der Wirkung von HNF4 α vergleichbarem Maße. Die Expression der MODY-Mutante R154X und der artifiziellen Mutante C106R (Daten nicht gezeigt) führen zu keiner morphologischen Veränderung der Zellen.

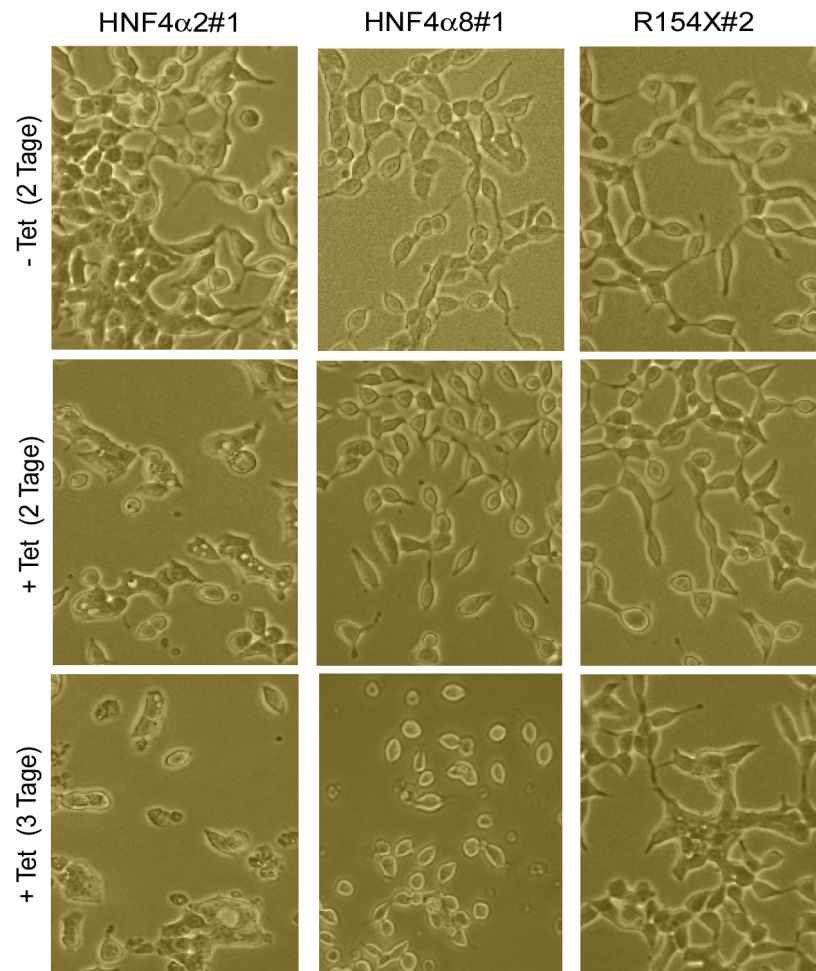


Abbildung 11: Morphologische Veränderungen der INS-1 Zellen nach Transgenexpression. Gezeigt sind Phasenkontrastbilder von INS-1 Flp-In T-REx Zellen ohne Behandlung mit Tetracyclin (-Tet) und mit Induktion der Transgenexpression durch Zugabe von 50 ng/ml Tetracyclin für zwei bzw. drei Tage.

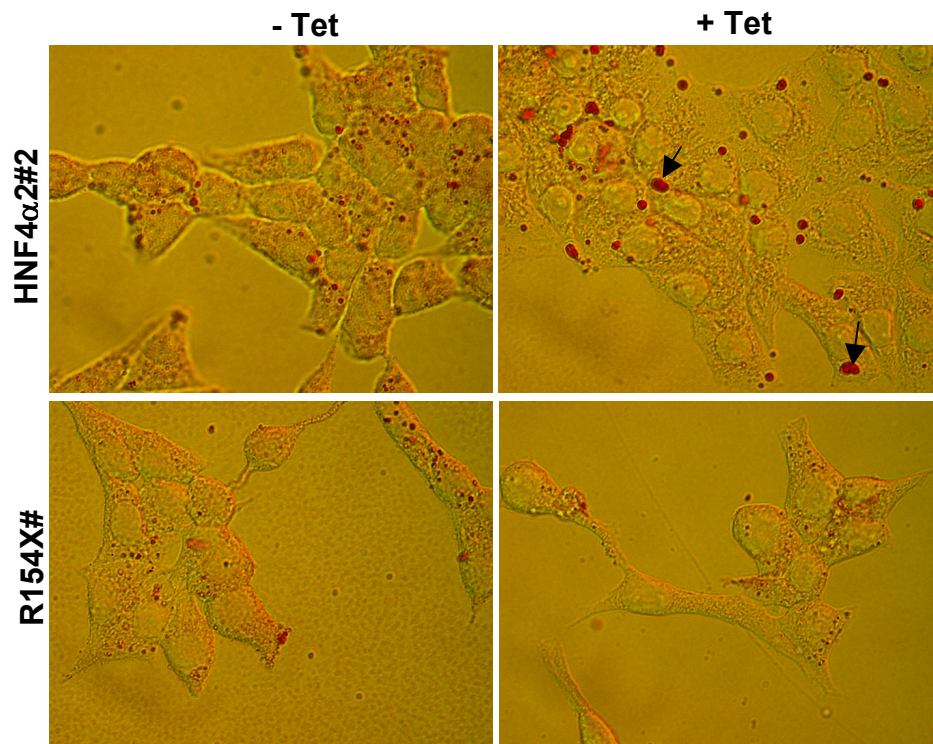


Abbildung 12: Ölrot o Färbung von INS-1 Flp-In T-REx Zellen zur Detektion von Lipid-Akkumulationen. Zellen der INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien HNF4 α 2 und R154X2 wurden nach 48 Stunden ohne (-Tet) oder mit (+Tet) Tetracyclin-Induktion von 50 ng/ml einer Ölrot o Färbung unterzogen. Auf den gezeigten Phasenkontrastbildern sind neutrale Lipide orange bis rot gefärbt, Lipidtropfen sind als orange bis rote Punkte sichtbar, zwei Beispiele sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Um eine mögliche Ursache für die starke Vakuolisierung nach Induktion der Expression von HNF4 α 2 zu finden und aufgrund der Tatsache, dass HNF4 α zahlreiche Gene reguliert, die am Metabolismus und Transport von Lipiden beteiligt sind, wurde eine Ölrot o Färbung der Zellen durchgeführt (Koopman et al., 2001). Ölrot o färbt neutrale Lipide, vor allem Triglyceride, orange bis rot. Wie in Abbildung 12 zu sehen, führt die Expression von HNF4 α 2 für 48 h zum Auftreten deutlich größerer Fetttropfen (s. Pfeil) in den Zellen, während die Expression der Mutante R154X keine Auswirkung auf die Lipidvesikel hat.

4 Die Expression von HNF4 α hemmt das Wachstum der INS-1 Zellen

Um das Zellwachstum zu bestimmen, wurde die metabolische Aktivität der Zellen ein bis sechs Tage nach Tetracyclin-Induktion mittels MTS Assay gemessen. Die beiden HNF4 α 2 exprimierenden Zelllinien zeigen eine rapide Abnahme der relativen Zellzahl, die in Abbildung 13 als Prozent der Zahl der entsprechenden nicht-induzierten Zellen dargestellt ist.

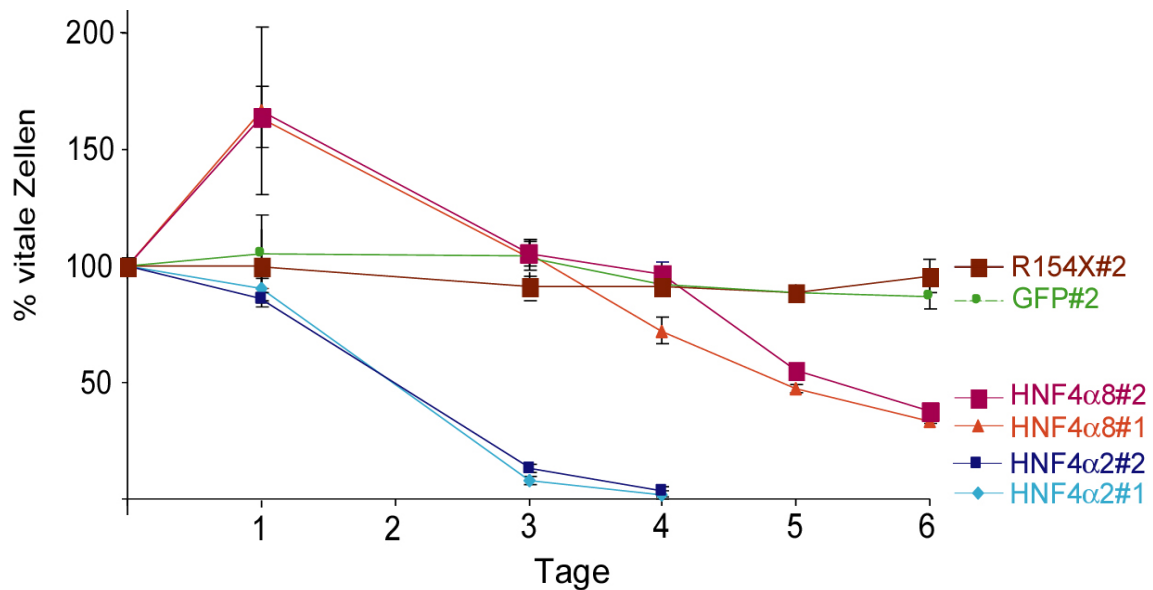


Abbildung 13: MTS Assay von INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Die Zellen wurden 1 bis 6 Tage mit 50 ng/ml Tetracyclin induziert und anschließend einem MTS Assay zur Bestimmung der relativen Anzahl vitaler Zellen unterzogen. Die angegebenen Prozente beziehen sich auf die entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Werten an.

Drei Tage nach Induktion der HNF4 α 2 Expression beträgt die relative Zellzahl nur noch etwa 10 % und nach 4 Tagen sind fast keine metabolisch aktiven Zellen mehr detektierbar. Die Induktion von HNF4 α 8 führt ebenfalls zu einer Abnahme der relativen Zellzahl, wenn auch in geringerem Ausmaß. Die Expression der Mutanten R154X und C106R (letztere dargestellt in Abb. 27), sowie von GFP, zeigt dagegen keine Auswirkung auf die Zellzahl. Da der MTS Assay für HNF4 α 8 einen Tag nach Induktion einen transienten Anstieg der relativen Zellzahl anzeigt, wurden direkte Zellzählungen mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Wie in Abbildung 14A ersichtlich, gibt es bei HNF4 α 8 Expression keinen signifikanten Anstieg der relativen Zellzahl, die vier Tage nach Induktion auf 40 % absinkt. Da der MTS Assay die metabolische Aktivität von Zellen misst, ist anzunehmen, dass die Expression von HNF4 α 8 zu einem vorübergehenden Anstieg der metabolischen Aktivität von INS-1 Zellen führt. Die Darstellung der absoluten Zellzahlen in Abb. 14B zeigt, dass die Induktion von HNF4 α 2 nicht nur zu einer Hemmung des Zellwachstums, sondern auch zu einer Verringerung der Zellzahl führt, so dass vier Tage nach Induktion der Expression weniger Zellen vorhanden sind, als zu Beginn ausgesät. Außerdem wird in dieser Darstellung deutlich, dass die unbehandelten Zelllinien vergleichbare aber nicht vollkommen identische Wachstumseigenschaften aufweisen. Grundsätzlich konnte für die

R154X Zelllinien ein langsames Wachstum als für die HNF4 α 8 und HNF4 α 2 Zelllinien beobachtet werden.

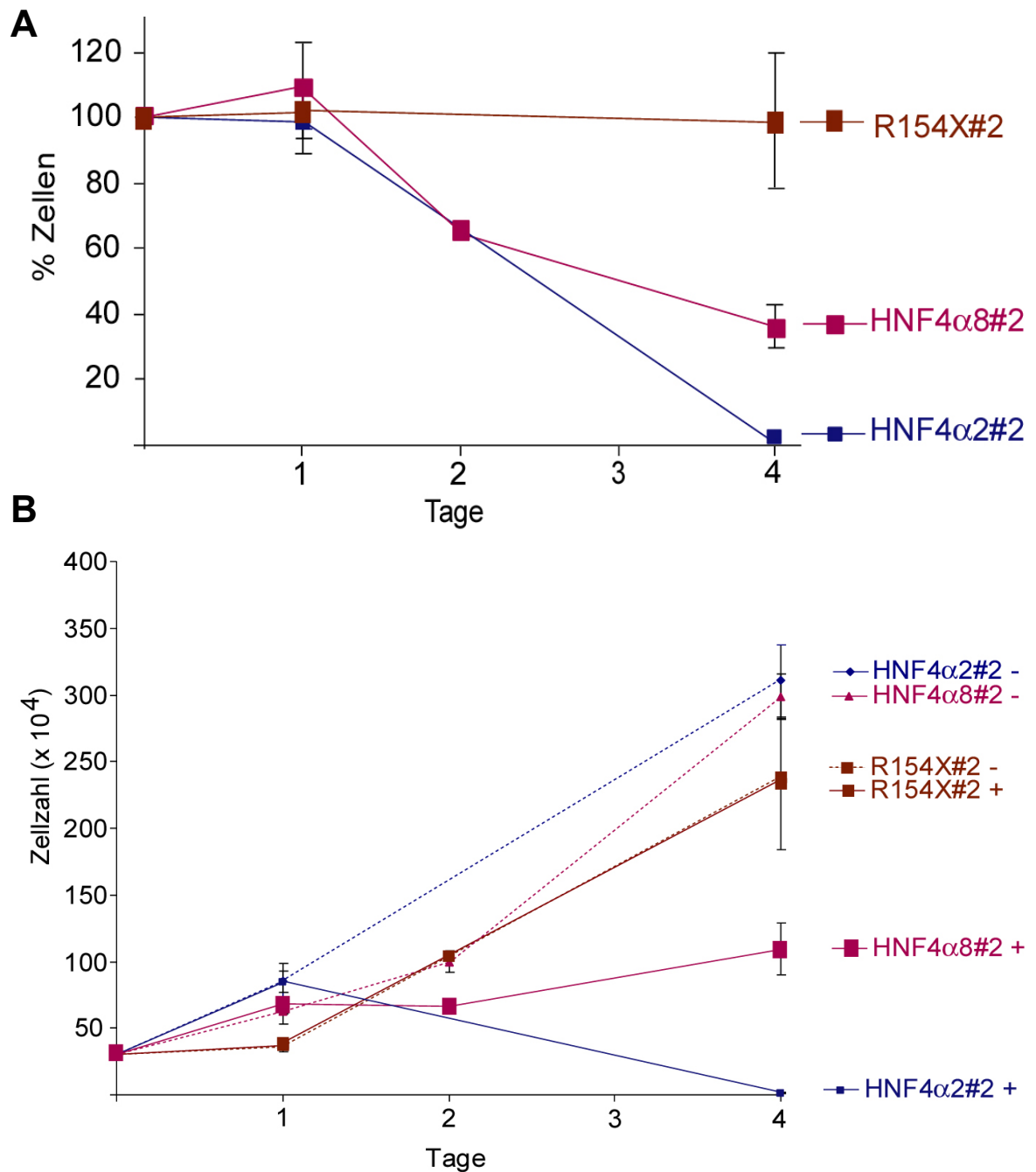


Abbildung 14: Zellwachstum der INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml induziert und nach den angegebenen Tagen mit Hilfe eines Hämatocytometers gezählt. A) Die Prozentangaben beziehen sich auf die entsprechenden nicht-induzierten Zellen. B) Darstellung der absoluten Zellzahlen von induzierten (+) und den entsprechenden nicht-induzierten (-) Zellen. Die Fehlerbalken in A) und B) geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Werten an.

5 Die Expression von HNF4 α führt zu einer Verringerung der Proliferationsrate von INS-1 Zellen

Um den Grund für das verminderte Zellwachstum nach Expression von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 festzustellen, wurde die DNA Synthese durch Inkubation der Zellen mit Bromodeoxyuridin (BrdU) und anschließender Durchflußzytometrie-Analyse gemessen. Das Thymidin-Analogon BrdU wird während des Zellzykluses bei der DNA-Synthese (S-Phase) eingebaut und bei der Durchflußzytometrie durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper detektiert. Wie in Figur 15A zu sehen, fällt der Anteil der Zellen, die innerhalb der einstündigen Inkubation mit BrdU dieses eingebaut haben und sich somit in der S-Phase befinden, von etwa 40 % bei den nicht-induzierten Zellen auf etwa 20 % zwei Tage nach Induktion der HNF4 α 2 Expression. Dies weist auf eine Reduktion der Zellproliferationsrate durch HNF4 α 2 hin. Im Gegensatz dazu hat die Expression von R154X oder GFP keinen Einfluß auf die Zellproliferation. HNF4 α 8 führt zu einem im Vergleich zu HNF4 α 2 verspäteten Effekt, da nach 2 Tagen Induktion keine Verringerung der die S-Phase durchlaufenden Zellen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Ein der Wirkung von HNF4 α 2 vergleichbarer Effekt wurde erst nach vier Tagen HNF4 α 8-Expression festgestellt (Abb. 15B).

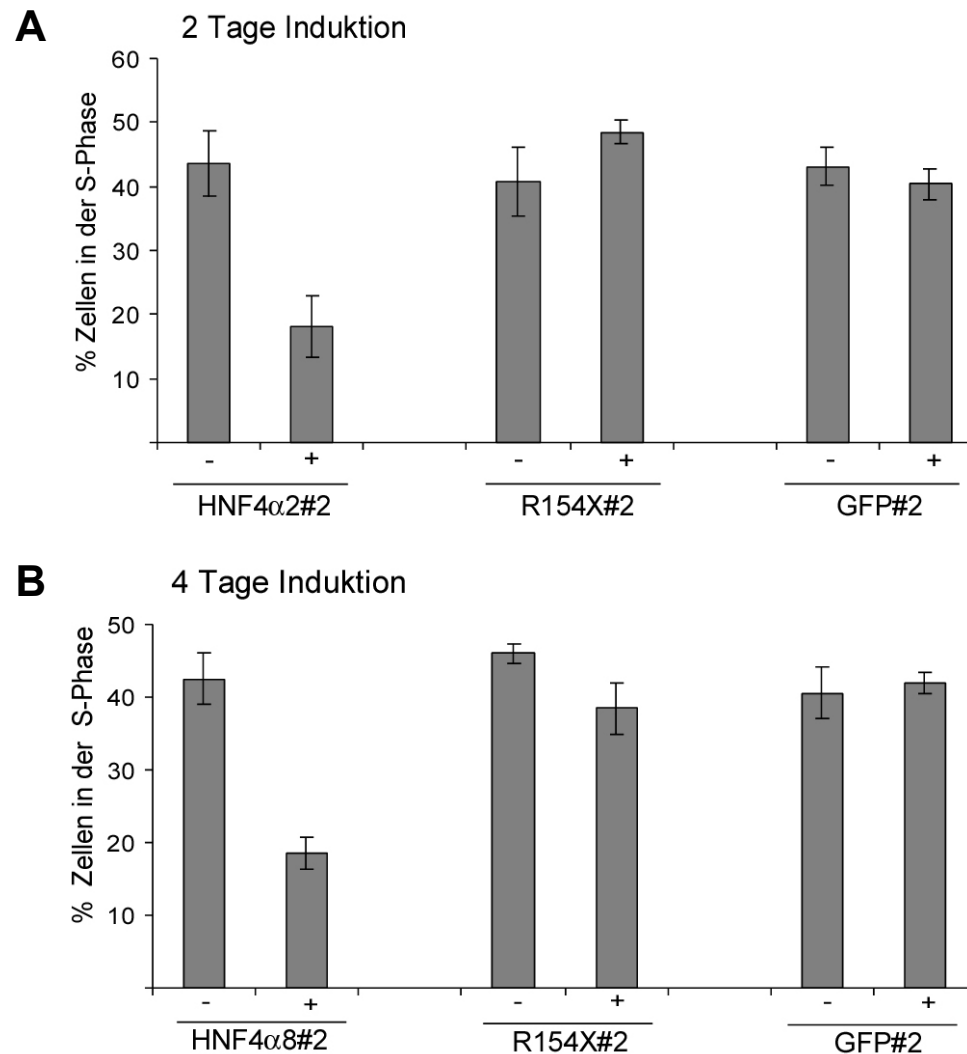


Abbildung 15: BrdU Einbau in INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Der Anteil der Zellen, die im Laufe einer Stunde BrdU inkorporiert haben, also in die S-Phase eingetreten sind, ist für nicht-induzierte (-) und induzierte (+) Zellen dargestellt. Die Induktion der Transgenexpression erfolgte zwei (A) oder vier (B) Tage. Der BrdU Einbau wurde durchflußcytometrisch bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Einzelwerte der Doppelbestimmung an.

6 Die Expression von HNF4 α induziert Apoptose in INS-1 Zellen

Da drei Tage nach Induktion von HNF4 α 2 weniger Zellen vorhanden sind als ursprünglich ausgesät (s. Abb. 14B) und tote Zellen deutlich sichtbar werden (s. Abb. 11), wurde eine mögliche Induktion von Apoptose untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt.

6.1 Der Anteil hypodiploider Zellen nimmt bei HNF4 α 2 Expression zu

Die DNA nicht-induzierter (-tet) und induzierter (+tet) Zellen wurde mit Propidium-Iodid angefärbt. Bei der anschließenden durchflußzytometrischen Analyse ist die Intensität des

Propidium-Iodid Signals direkt proportional zum DNA Gehalt der Zellen, die so den Stadien des Zellzykluses zugeordnet werden können. Im sogenannten subG₁-Bereich befinden sich dabei potentiell apoptotische Zellen, da diese im Verlauf der Apoptose durch internukleosomale Spaltung zunehmend DNA verlieren und ihr DNA-Gehalt auf ein hypodiploides Niveau absinkt (Vermes et al., 2000). Abbildung 16 zeigt einen Anstieg der subG₁-Zellen bei HNF4 α 2 Induktion von 3 % (nicht-induziert) auf 17 % (induziert) nach zwei Tagen, während die Induktion von R154X keinen Effekt zeigt.

Die Induktion von HNF4 α 8 führte nach zwei und nach vier Tagen zu keinen signifikanten Änderungen in der Zellzyklusverteilung der INS-1 Zellen (Daten nicht gezeigt).

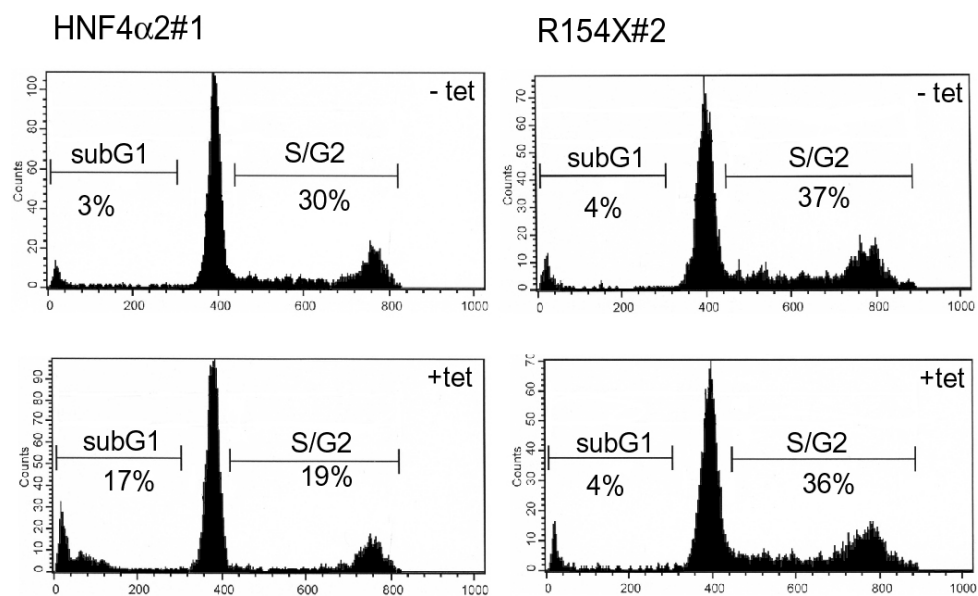


Abbildung 16: Zellzyklus Analyse von INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Die Zellen wurden nach 48 Stunden ohne (-) oder mit (+) Induktion durch 50 ng/ml Tetracyclin geerntet, fixiert und mit Propidium-Iodid gefärbt. Die Intensität der Färbung, die direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist, wurde durchflußcytometrisch bestimmt. Die Verteilung der detektierten Zellen (Counts, Y-Achse) auf die Intensitäten (X-Achse) ist dargestellt. Der Anteil der Zellen im subG₁ Bereich, die potentiell apoptotisch sind, sowie in der S/G2 Phase, ist angegeben.

6.2 HNF4 α 2 Expression führt zu internukleosomaler DNA-Spaltung in INS-1 Zellen

Ein wichtiges Merkmal der Apoptose ist der Abbau der genomischen DNA durch Endonukleasen. Die dabei entstehenden DNA-Stücke sind Vielfache von 180-200bp Fragmenten und können im Agarosegel als 200bp-Leiter sichtbar gemacht werden.

Abbildung 17 zeigt das für apoptotische Zellen charakteristische Bandenmuster bei genomischer DNA von Zellen, in denen 1,5 oder 2 Tage die Expression von HNF4 α 2 induziert wurde. Die genomische DNA der entsprechenden nicht-induzierten Zellen sowie

nicht-induzierter und induzierter Flp-In T-REx R154X Zellen zeigt keine DNA-Fragmente. Die Induktion der Expression von HNF4 α 8 für ein, zwei oder drei Tage führt ebenfalls nicht zu der Ausbildung der DNA-Leiter (Daten nicht gezeigt).

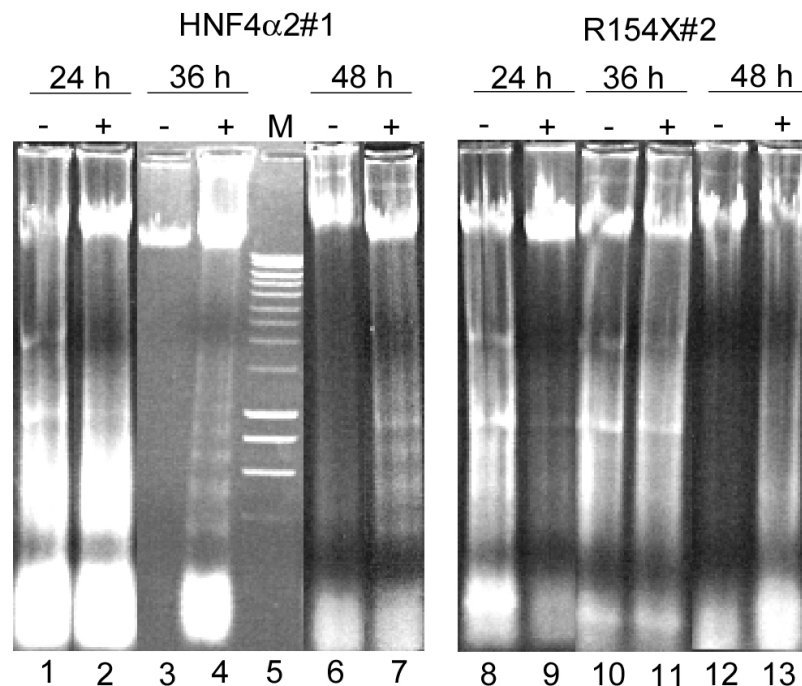


Abbildung 17: Analyse der genomischen DNA von INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Die Zellen wurden 24, 36 oder 48 Stunden ohne (-) oder mit (+) 50 ng/ml Tetracyclin kultiviert, geerntet und die genomische DNA isoliert. Diese wurde in einem 1,5 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. In den Spuren 4 und 7 zeigt sich die für Apoptose charakteristische Spaltung der DNA in die 200 bp Leiter. M: SMART Ladder als Größenstandard

6.3 HNF4 α 2 und HNF4 α 8 steigern die Aktivität von Caspase 3/7

Die als Caspasen bezeichneten Cystein-Proteasen sind zentrale Mediatoren der Apoptose und tragen entscheidend zur spezifischen Degradation zellulärer Komponenten während des apoptotischen Prozesses bei. Die Aktivierung der wichtigen Effektor-Caspasen 3 und 7 ist dabei ein charakteristisches Ereignis, das hier mit Hilfe eines Lumineszenz Assays gemessen wurde. Wie in Abbildung 18 gezeigt, führt die Induktion der HNF4 α 2 Expression ab 1,5 Tagen zu einer signifikanten Steigerung der Caspase 3/7 Aktivität relativ zu deren Aktivität in den entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Nach drei Tagen wurde eine etwa 3-fache Erhöhung der Aktivität in den induzierten Zellen gemessen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass drei Tage nach HNF4 α 2 Induktion eine etwa 10-fache Verringerung der Zellzahl eintritt (s. Abb. 13), ergibt sich eine ungefähr 30-fache Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität nach drei Tagen induzierter HNF4 α 2 Expression. Für HNF4 α 8 erhält man zwei Tage nach Induktion eine etwa 2,4-fache Erhöhung der Caspase-Aktivität, wenn man eine Zellzahl von 65 % für die induzierten im Vergleich zu den nicht-

induzierten Zellen mit einbezieht (s. Abb.14A). Die Wirkung von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 ist spezifisch, da weder die Expression der MODY Mutante R154X (Abb. 18), noch die der künstlichen Mutante C106R (s. Abb. 28), zu einer Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität führt.

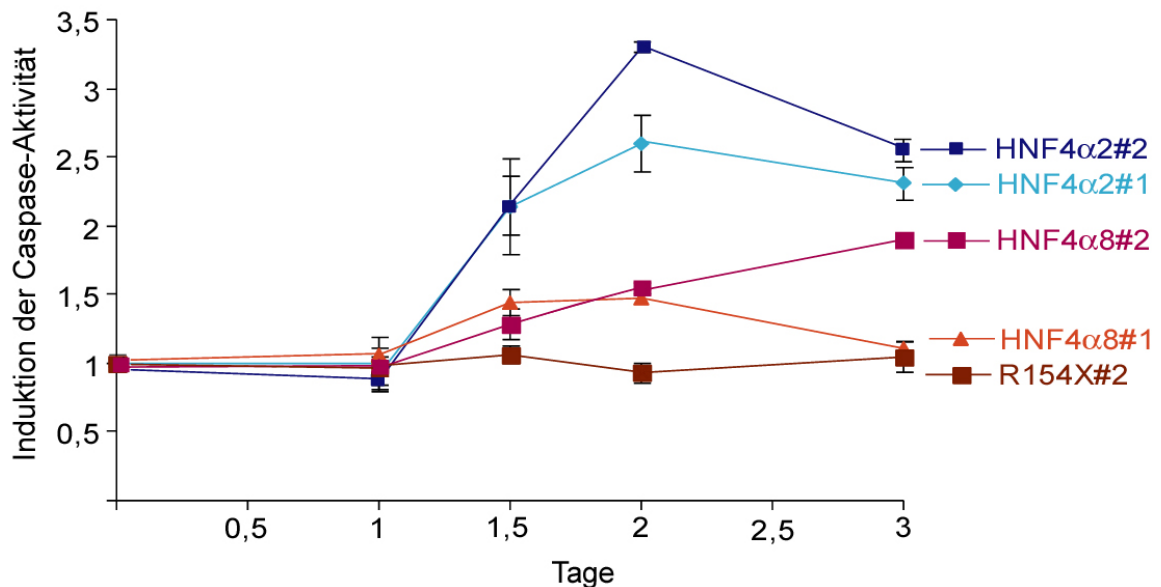


Abbildung 18: Messung der Caspase-Aktivität in INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde ein bis drei Tage nach Induktion der Transgenexpression mit 50 ng/ml Tetracyclin mit Hilfe des luminometrischen Caspase-Glo™ 3/7 Assays (Promega) gemessen. Die angegebene fache Induktion bezieht sich auf die entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei unabhängigen Werten an.

Abschließend läßt sich sagen, dass mit drei unabhängigen Methoden gezeigt werden konnte, dass HNF4 α 2 in INS-1 Zellen Apoptose induziert. Dagegen konnte für HNF4 α 8 nur im Caspase 3/7 Assay, der die sensitivste der drei Nachweismethoden darstellt, ein Hinweis für das Auftreten von Apoptose festgestellt werden, wenn auch in weit geringerem Ausmaß als für HNF4 α 2.

7 Zielgene von HNF4 α 2 und HNF4 α 8

7.1 Microarray Analysen

Die sogenannte Microarray Technologie erlaubt die schnelle Analyse von Expressionsprofilen, die das Expressionsniveau tausender Gene umfassen.

Um Kandidaten-Gene zu suchen, die die antiproliferativen und apoptotischen Effekte von HNF4 α vermitteln und um mögliche unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen HNF4 α 2 und HNF4 α 8 in β -Zellen zu charakterisieren, wurden Microarray Analysen mit den Flp-In T-REx Zelllinien HNF4 α 2, HNF4 α 8 und R154X, durchgeführt. Unter

Verwendung des Affymetrix GeneChip RAE230A, der mehr als 15.000 Probensets enthält, die über 14.000 Gene bzw. ESTs der Ratte repräsentieren, wurden die Expressionsprofile von induzierten (50 ng/ml Tetracyclin) und von den entsprechenden nicht-induzierten Zellen 24 Stunden nach Tetracyclinzugabe verglichen. Gene wurden als Zielgen-Kandidaten gewertet, wenn sie in beiden der zwei unabhängigen Zelllinien von jedem Konstrukt ein mindestens zweifach erhöhtes oder verringertes Expressionsniveau in den induzierten gegenüber den nicht-induzierten Zellen aufwiesen. Außerdem mussten die Kandidaten in jedem nicht-induziert/induziert Paar mindestens einen sogenannten „Present-Call“ (oder „Marginal-Call“) erzielen, d.h. in entweder den nicht-induzierten oder den entsprechenden induzierten Zellen als vorhanden eingestuft werden.

Unter Verwendung dieser Auswahlkriterien ergaben sich für HNF4 α 2 257 und für HNF4 α 8 100 differentiell exprimierte Probensets (s. Tabellen AI-AVI). Für R154X wurde nur ein reguliertes Gen gefunden, welches für den Lipidtransporter ApoC1 kodiert, das jedoch nicht unter den durch HNF4 α 2 oder HNF4 α 8 regulierten Kandidaten ist. Das bedeutet, dass alle diese Probensets potentielle Kandidaten für die Vermittlung der antiproliferativen und apoptotischen Effekte der beiden HNF4 α Isoformen sind. Die Venn Diagramme der Ziel-Gene in Abbildung 19 zeigen, dass die Mehrzahl der betroffenen Transkripte hochreguliert ist. HNF4 α 8 beeinflusst eine wesentlich geringere Anzahl von Genen, wobei etwa 70 % mit den Ziel-Genen von HNF4 α 2 überlappen. Gegensätzliche Regulationen treten nicht auf. Etwa 50 % der regulierten Probensets sind nach Affymetrix Angaben bestimmten Genen zugeordnet (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

Um darzustellen, in welche biologischen Prozesse die beiden HNF4 α Isoformen involviert sind, wurden die potentiellen Zielgene in Tabelle I entsprechend ihrer „gene ontology“ (GO) Bezeichnungen (Ashburner et al., 2000), die für etwa 30 % der betroffenen Gene zur Verfügung stehen, bestimmten Kategorien zugeordnet. Diese Zuordnung zeigt, dass der von beiden Isoformen hauptsächlich beeinflusste biologische Prozeß der Metabolismus ist. Eine hypergeometrische Verteilungsanalyse zeigt eine statistische signifikante Überrepresentation in dieser Kategorie.

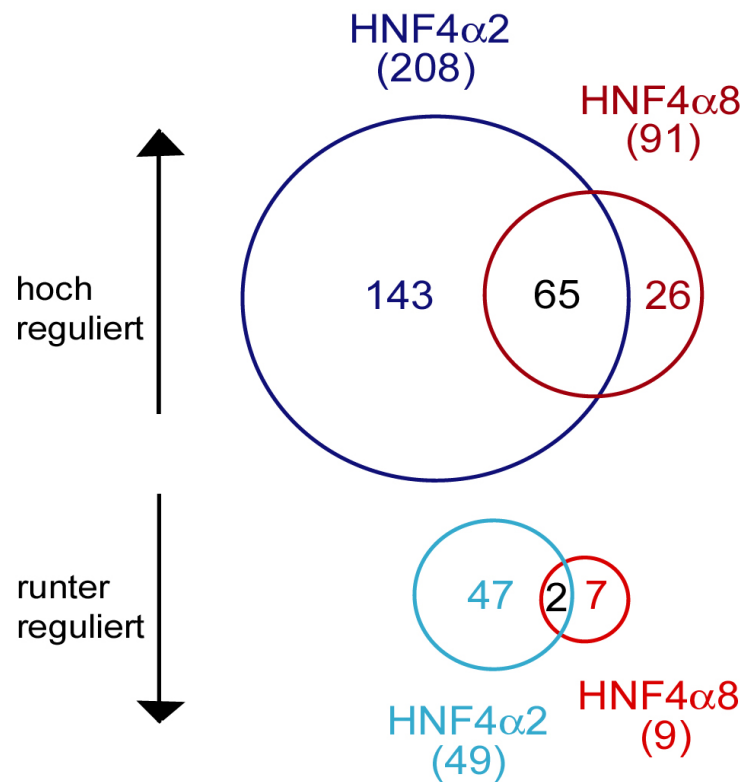


Abbildung 19: Darstellung der in der Microarray Analyse von HNF4α2 und HNF4α8 regulierten Probensets in Form von Venn Diagrammen. Die Analyse wurde 24 Stunden nach Induktion der Transgenexpression mit 50 ng/ml Tetracyclin durchgeführt. Die Zahlen in den überlappenden Bereichen zeigen Probensets an, die von beiden Isoformen reguliert werden. Die Zahlen in Klammern geben die Gesamtzahl der von der betreffenden Spleißform hoch- bzw. runterregulierten Probensets an.

Tabelle I: Zuordnung der Gene zu Kategorien der GO biologische Prozesse

| | HNF4α2 | HNF4α8 | RAE230A |
|--|---------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Probensets mit zugeordneten GO biologischen Prozessen | 71 | 34 | 2652 |
| Metabolismus | 47*** | 23* | 1257 |
| Proteinmetabolismus | 7 | 5 | 456 |
| Vitaminmetabolismus | 4*** | 2* | 13 |
| Lipidmetabolismus | 9* | 2 | 162 |
| Nukleobasen, Nukleosid, Nucleotid und Nukleinsäuremetabolismus | 6 | 4 | 380 |
| Phosphormetabolismus | 3 | 1 | 183 |
| Energieweg | 8*** | 3* | 59 |
| Metabolismus von Aminosäuren und Aminosäurederivaten | 9*** | 3 | 70 |
| Metabolismus organischer Säuren | 13*** | 4 | 116 |
| Elektronentransport | 5 | 2 | 91 |
| Aminmetabolismus | 9 | 3 | 70 |
| Alkoholmetabolismus | 8*** | 3 | 75 |
| Biosynthese | 11 | 5 | 268 |
| Kohlenhydratmetabolismus | 9*** | 3 | 86 |
| Metabolismus von Coenzymen und prosthetischen Gruppen | 2 | 3** | 33 |
| Schwefelmetabolismus | 2* | 3*** | 11 |
| Katabolismus | 11* | 5 | 222 |
| Organismal physiological process | 6 | 3 | 371 |
| Antwort auf Stimulus | 12 | 6 | 328 |
| Antwort auf externen Stimulus | 12 | 6 | 279 |
| Antwort auf Stress | 8 | 5 | 183 |
| Zelluläre physiologische Prozesse | 19 | 8 | 1022 |
| Zellwachstum und/oder maintenance | 18 | 7 | 905 |
| Transport | 13 | 4 | 583 |
| Zellproliferation | 2 | 1 | 185 |
| Zellkommunikation | 12 | 7 | 807 |
| Signaltransduktion | | | |
| Entwicklung | 8 | 3 | 452 |
| Morphogenese | 6 | 2 | 318 |
| Programmierter Zelltod | 2 | - | 79 |

Die Probensets wurden entsprechend ihrer „gene ontology“ (GO) Bezeichnungen (Ashburner et al., 2000), die für etwa 30 % der betroffenen Gene zur Verfügung stehen, bestimmten Kategorien des Oberbegriffes „biologische Prozesse“ zugeordnet. Probensets, die demselben Gen entsprechen, wurden nur einmal gezählt. Alle Kategorien, denen mindestens drei Probensets zugeordnet werden konnten, sind in der Tabelle aufgeführt, die Kategorien Zellproliferation und programmierter Zelltod sind wegen ihrer besonderen Wichtigkeit für die Arbeit aufgelistet, obwohl ihnen nur höchstens zwei Probensets zufallen. Kategorien sind fett gedruckt, wenn sie den folgenden Kategorien übergeordnet sind.

Die Summe der zugeordneten Probensets entspricht nicht der Anzahl der insgesamt von den Isoformen regulierten Sets, da einzelne Probensets mehreren Kategorien zugeordnet sein können, Kategorien mit weniger als drei Probensets nicht aufgeführt sind und redundante Probensets aussortiert wurden. Die Verteilung aller Probensets des Affymetrix Microarrays RAE230A auf die angegebenen Kategorien ist als Referenz mit aufgeführt. Um festzustellen, ob Gene in einer bestimmten Kategorie überrepräsentiert sind, wurde eine hypergeometrische Verteilungsanalyse durchgeführt (http://genome-www5.stanford.edu/help/GO-TermFinder/GO_TermFinder_help.shtml). Werte, die eine Überrepräsentation zeigen sind mit *, ** und *** gekennzeichnet, für p-Werte von $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

7.2 Microarray Analysen zum Vergleich der Expressionsprofile von HNF4 α 2, HNF6 und HNF1 β in INS-1 Zellen

Um die durch HNF4 α regulierten Gene zu werten, wurden zum Vergleich die Gene ermittelt, die durch HNF6 oder HNF1 β in INS-1 Zellen reguliert wurden. Dazu wurden Microarray Analysen, unter Verwendung des Affymetrix GeneChip RAE230A, mit jeweils zwei unabhängigen Flp-In T-REx Zelllinien zur Expression von HNF4 α 2, HNF6 (etabliert von Heike Thomas und Tanja Arndt) und HNF1 β (etabliert von Sabine Senkel) durchgeführt (Thomas et al., 2004). Alle Zelllinien basieren dabei auf dem Flp-In T-REx Ausgangszellklon 1-1.2. Zur Ermittlung der Zielgene der drei Faktoren wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin 24 Stunden induziert und die entsprechenden unbehandelten Zellen dienten als Referenz. Gene wurden als potentielle Zielgene gewertet, wenn sie in beiden Zelllinien eines Transkriptionsfaktors mindestens um das 2,5-fache hoch- oder runterreguliert waren und die Regulation einen p-Wert $< 0,001$ oder $> 0,999$ aufwies. Zusätzlich mussten die entsprechenden Transkripte in jedem nicht-induziert/induziert Paar mindestens einmal als vorhanden eingestuft sein („Present-Call“ oder „Marginal-Call“). Auf diese Weise ergeben sich für HNF4 α 2 338, für HNF6 222 und für HNF1 β 292 regulierte Probensets. Das Venn Diagramm in Abbildung 20 zeigt, dass dabei die Überschneidungen wesentlich geringer sind als bei dem Vergleich der Zielgene von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 (s. Abb. 19). Nur 16 Probensets wurden von allen drei Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Die Zuordnung zu biologischen Prozessen entsprechend der GO Bezeichnung (s. Tabelle II) bestärkt den Eindruck weiter, dass die drei Faktoren verschiedene Eigenschaften und Funktionen in Bezug auf ihre biologische Rolle in β -Zellen haben. Die hypergeometrische Analyse zeigt in verschiedenen Kategorien eine statistisch signifikante Überrepräsentation, in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor. Während diese Analyse für HNF4 α eine vordringliche Rolle bei der Regulation metabolischer Prozesse bestätigt, beeinflussen HNF6 und HNF1 β hauptsächlich die Aktivität von Genen, die an der Entwicklung beteiligt sind (s. Tabelle II).

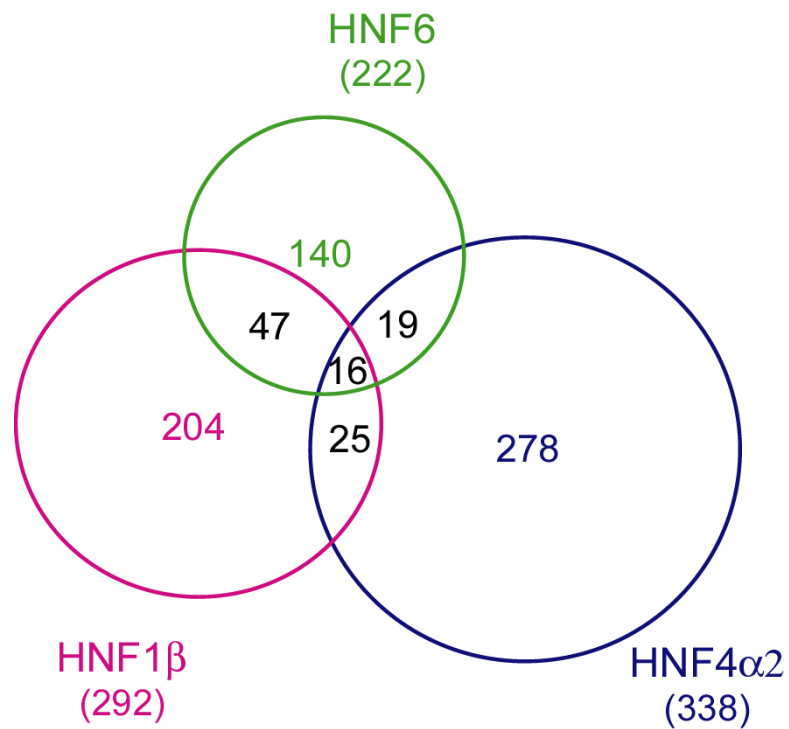


Abbildung 20: Darstellung der in der Microarray Analyse von HNF4α2, HNF6 und HNF1β regulierten Probensets in Form eines Venn Diagramms. Die Analyse wurde 24 Stunden nach Induktion der Transgenexpression mit 1 µg/ml Tetracyclin durchgeführt. Die Zahlen in den überlappenden Bereichen zeigen Probensets an, die von beiden bzw. allen drei Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Die Zahlen in Klammern geben die Gesamtzahl der von den einzelnen Transkriptionsfaktoren regulierten Probensets an.

Table II: Zuordnung der Gene zu Kategorien der GO biologische Prozesse

| | HNF6 | HNF4α | HNF1β | RAE230A |
|--|---------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------|
| Probensets mit zugeordneten GO biologischen Prozessen | 60 | 95 | 91 | 2652 |
| Metabolismus | 28 | 50 | 46 | 1257 |
| Proteinmetabolismus | 7 | 14 | 12 | 456 |
| Transkription | 11 * | 5 | 12 | 265 |
| Phosphormetabolismus | 6 | 6 | 5 | 183 |
| Energieweg | 3 | 8 ** | 2 | 59 |
| Metabolismus von Aminosäuren und Aminosäurederivaten | 1 | 7 * | 4 | 70 |
| Metabolismus organischer Säuren | 1 | 11 ** | 4 | 116 |
| Elektronentransport | 1 | 6 | 3 | 91 |
| Aminmetabolismus | 1 | 7 * | 4 | 70 |
| Alkoholmetabolismus | 4 | 7 * | 1 | 75 |
| Biosynthese | 4 | 9 | 6 | 268 |
| Kohlenhydratmetabolismus | 2 | 6 | 1 | 86 |
| Katabolismus | 1 | 12 | 7 | 222 |
| Organismische physiologische Prozesse | 6 | 10 | 9 | 371 |
| Antwort auf Stimulus | 5 | 10 | 10 | 328 |
| Zelluläre physiologische Prozesse | 27 | 34 | 44 * | 1022 |
| Zellbewegung | 5 ** | 2 | 4 | 59 |
| Zellproliferation | 6 | 5 | 6 | 185 |
| Transport | 11 | 21 | 26 | 583 |
| Zellorganisation und -biogenese | 2 | 6 | 2 | 151 |
| Regulation zellulärer Prozesse | 6 * | 3 | 6 | 118 |
| Zellkommunikation | 19 | 26 | 20 | 807 |
| Intrazelluläre Signalkaskade | 7 | 7 | 9 | 235 |
| Zelloberflächen-Rezeptor gekoppelte Signaltransduktion | 12 | 10 | 10 | 331 |
| Zelladhäsion | 0 | 6 | 3 | 118 |
| Entwicklung | 22 *** | 17 | 27 ** | 452 |
| Zelldifferenzierung | 6 * | 2 | 6 | 97 |
| Morphogenese | 17 *** | 12 | 21** | 318 |
| Neurogenese | 10 ** | 8 | 10 * | 145 |

Die Probensets wurden entsprechend ihrer „gene ontology“ (GO) Bezeichnungen (Ashburner et al., 2000), die für etwa 30 % der betroffenen Gene zur Verfügung stehen, bestimmten Kategorien des Oberbegriffes „biologische Prozesse“ zugeordnet. Probensets die demselben Gen entsprechen wurden nur einmal gezählt. Alle Kategorien denen mindestens fünf Probensets zugeordnet werden konnten sind in der Tabelle aufgeführt. Kategorien sind fett gedruckt, wenn sie den folgenden Kategorien übergeordnet sind. Die Summe der zugeordneten Probensets entspricht nicht der Anzahl der insgesamt von den Isoformen regulierten Sets, da einzelne Probensets mehreren Kategorien zugeordnet sein können, Kategorien mit weniger als fünf Probensets nicht aufgeführt sind und redundante Probensets aussortiert wurden. Die Verteilung aller Probensets des Affymetrix Microarrays RAE230A auf die angegebenen Kategorien ist als Referenz mit aufgeführt. Um festzustellen ob Gene in einer bestimmten Kategorie überrepräsentiert sind wurde eine hypergeometrische Verteilungsanalyse durchgeführt (http://genome-www5.stanford.edu/help/GO-TermFinder/GO_TermFinder_help.shtml). Werte, die eine Überrepräsentation zeigen sind mit *, ** und *** gekennzeichnet, für p-Werte von $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

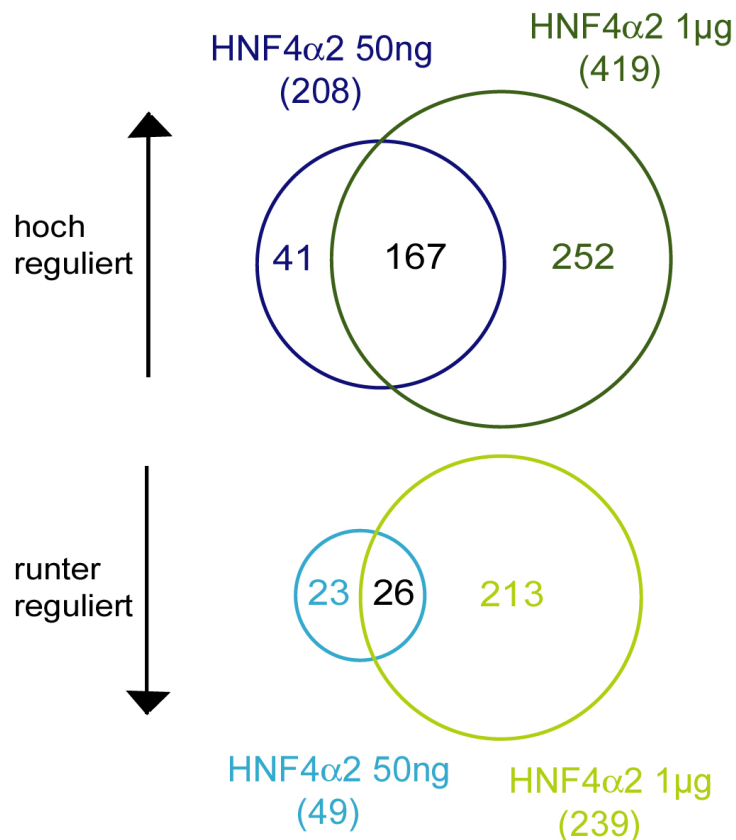


Abbildung 21: Darstellung der in den Microarray Analysen von HNF4α2 hoch- bzw. runterregulierten Probensets als Venn Diagramme. Für die Analyse wurden die Zellen 24 Stunden mit 50 ng/ml bzw. 1 µg/ml Tetracyclin induziert, die entsprechenden nicht-induzierten Zellen dienten als Referenz. Die Zahlen in den überlappenden Bereichen zeigen Probensets an, die in beiden Analysen reguliert werden. Die Zahlen in Klammern geben die Gesamtzahl der bei den einzelnen Analysen von HNF4α2 hoch- bzw. runterregulierten Probensets an.

Um die Ergebnisse dieser Microarray Analyse nach Induktion der Expression von HNF4α2 mit 1 µg/ml Tetracyclin mit der in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Induktion mit 50 ng/ml zu vergleichen, wurden bei beiden Analysen die Probensets als Zielgene ausgewählt, die in beiden Zelllinien nach Induktion mindestens 2 -fach hoch- oder runterreguliert waren und die in jedem nicht-induziert/induziert Paar mindestens einmal als vorhanden eingestuft wurden. Die resultierenden Zielgene sind in Abbildung 21 als Venn Diagramme dargestellt und zeigen, dass nach Induktion mit 1 µg/ml Tetracyclin deutlich mehr Probensets reguliert, vor allem herunterreguliert, sind als nach Zugabe von 50 ng/ml, wobei die Zielgenmengen sich größtenteils überschneiden. Die für uns interessanten Zielgenkandidaten mit einer Verbindung zu Zellproliferation oder Apoptose sollten jedoch bereits bei Zugabe von 50 ng/ml Tetracyclin reguliert werden, da die Effekte auf Zellwachstum, Zellproliferation und Apoptose bei dieser Konzentration nachgewiesen wurden.

7.3 Microarray Zielgen-Kandidaten mit Verbindung zu Zellproliferation oder Apoptose

Die Zuordnung zu den GO biologischen Prozessen ergab für HNF4 α 2 (Induktion mit 50 ng/ml Tetracyclin) in den für diese Arbeit besonders interessanten Kategorien Zellproliferation und programmierter Zelltod jeweils zwei Probensets. Der Zellproliferation wurden Cyclin D1 (Ccnd 1) und der Apoptose induzierende Faktor 1 (AIF/Pdcd8) zugeordnet, der Apoptose ebenfalls AIF und der Nervenwachstumsfaktorrezeptor (nerve growth factor receptor, ngfr). Cyclin D1 wurde als Kandidat ausgeschlossen, da für die Sequenz des Probensets bei einer BLAST-Datenbanksuche keine exakte Übereinstimmung mit vorhandenen Cyclin D1 Sequenzen gefunden werden konnte. Hinzu kommt, dass Cyclin D1 durch zwei weitere Probensets auf dem Array vertreten ist, die keine Regulation durch HNF4 α zeigten.

Von den durch HNF4 α 8 regulierten Probensets wurde nur eines der Zellproliferation zugeordnet, ID2 (inhibitor of DNA binding 2), ein Inhibitor von basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren. Da HNF4 α 2 jedoch in den funktionellen Assays den weit größeren Einfluß auf Zellproliferation und Apoptose zeigt, wurde die Suche nach Kandidaten, die diese Effekte vermitteln könnten, auf HNF4 α 2 Zielgene fokussiert.

Da die Mehrzahl der Gene keine GO Bezeichnung haben, wurden die Zielgene weiter mit Hilfe von Online-Datenbanken wie OMIM und PubMed auf mögliche Verbindungen zu Apoptose oder Zellproliferation geprüft. Dabei wurde KAI1 (kangai) gefunden, ein Transmembranprotein, von dem gezeigt wurde, dass es in verschiedenen Zelllinien Apoptose auslösen kann (Schoenfeld et al., 2004).

Tabelle III: Induktion von AIF, ngfr und KAI1

| | Analyse I | | Analyse II |
|------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | HNF4 α 2 (50 ng) | HNF4 α 8 (50 ng) | HNF4 α 2 (1 μ g) |
| AIF | 2,4 | n.i. | 3,5 |
| ngfr | 0,26 | n.i. | 0,05 |
| KAI1 | 3,8 | 2,6 | 4,7 |

Die Induktion der Gene AIF, ngfr und KAI1 in den INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien nach Behandlung mit 50 ng/ml bzw. 1 μ g/ml Tetracyclin. Dargestellt sind die Mittelwerte der Microarray Analysen der beiden jeweils für einen Transkriptionsfaktor untersuchten Zelllinien. n.i.: nicht-induziert

In Tabelle III sind die drei ausgewählten Kandidaten aufgeführt, die von HNF4 α reguliert werden. Der Effekt ist nach Induktion mit 1 μ g/ml Tetracyclin stärker als mit 50 ng/ml Tetracyclin.

7.4 Bestätigung ausgewählter Zielgen-Kandidaten durch real time RT-PCR

Die real time PCR stellt eine unabhängige, sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von RNA dar. Dabei kann die Entstehung des PCR Produktes durch die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe oder Reporter-Moleküle in Echtzeit verfolgt werden, wobei die Zunahme der Fluoreszenzaktivität direkt proportional zum gebildeten PCR Produkt ist. Diese Detektion des Reaktionsverlaufes erlaubt es, die exponentielle Phase der Amplifikation festzustellen, was für eine präzise Quantifizierung der RNA-Ausgangsmenge wichtig ist.

Zunächst wurde mittels real time PCR die HNF4 α -abhängige Regulation der drei ausgewählten Kandidaten (s. Kap. III.7.3.) überprüft. Außerdem wurden exemplarisch einige Kandidaten ausgewählt, bei denen die spezifische Regulation durch eine der beiden Isoformen bestätigt werden sollte: der Asialoglycoprotein Rezeptor 1 (asgr 1) wird der Microarray Analyse zufolge von beiden Spleißformen reguliert, der Neuromedin B Rezeptor nur von HNF4 α 2 und die Alanyl(membran)aminopeptidase sowie Transthyretin vorwiegend von HNF4 α 8. In der real time PCR wurde cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription aus der RNA nicht-induzierter und induzierter Flp-In T-REx INS-1 Zellen der HNF4 α 2, HNF4 α 8 und R154X Zelllinien isoliert worden war. Es wurden etablierte Primer und TaqMan-Sonden für die spezifische Detektion des jeweiligen Genes eingesetzt. In jeder Probe eines Tests wurde auch die 18S RNA Menge bestimmt und als interner Standard verwendet.

Wie in Abb. 22 zu sehen, konnte für sechs von sieben Genen eine Regulation durch HNF4 α in der real time RT-PCR bestätigt werden. Nur die Analyse der Expression von ngfr zeigt im Widerspruch zu den Microarray Daten für die Zelllinie HNF4 α 8#1 eine leichte Hoch- statt Runterregulation bei HNF4 α 8 Expression. Außerdem ergibt sich auch in beiden R154X Zelllinien bei Induktion eine Runterregulation (s. Abb. 22A). Daher wird ausgeschlossen, dass ngfr die antiproliferativen oder apoptotischen Effekte von HNF4 α vermittelt.

Die Regulation der beiden weiteren, mit dem Zellwachstum im Zusammenhang stehenden Kandidaten, KAI1 und AIF, konnte durch die real time RT-PCR bestätigt werden. Die KAI1 Expression wurde durch HNF4 α 2 und HNF4 α 8 Expression, aber nicht durch die Expression der MODY Mutante R154X erhöht (s. Abb. 22C). Dagegen erfolgt eine Erhöhung der AIF Transkriptmenge nur nach HNF4 α 2 Expression, während die Induktion

von HNF4 α 8 und R154X keine signifikante Auswirkung zeigt (Abb. 22B), in Übereinstimmung mit der HNF4 α 2 spezifischen Regulation in der Microarray Analyse.

Für den Asialoglykoprotein Rezeptor 1 (asgr, Abb. 22D), den Neuromedin B Rezeptor (Abb. 22E), die Alanyl(m)aminopeptidase (Abb. 22F) und Transthyretin (Abb. 22G) konnte mittels der real time RT-PCR jeweils die Regulation durch HNF4 α bestätigt werden, nicht jedoch die ausschließliche oder vorwiegende Beeinflussung durch eine der beiden Isoformen.

Die stark unterschiedlichen Werte der Induktionen, die zu beobachten sind, ergeben sich teilweise durch die unterschiedlichen Algorithmen, die bei der Auswertung der Microarray und real time PCR Daten verwendet werden, hauptsächlich aber durch zum Teil extrem geringe Werte der nicht-induzierten Proben, die bei kleinen Änderungen zu enormen Schwankungen der Induktion führen.

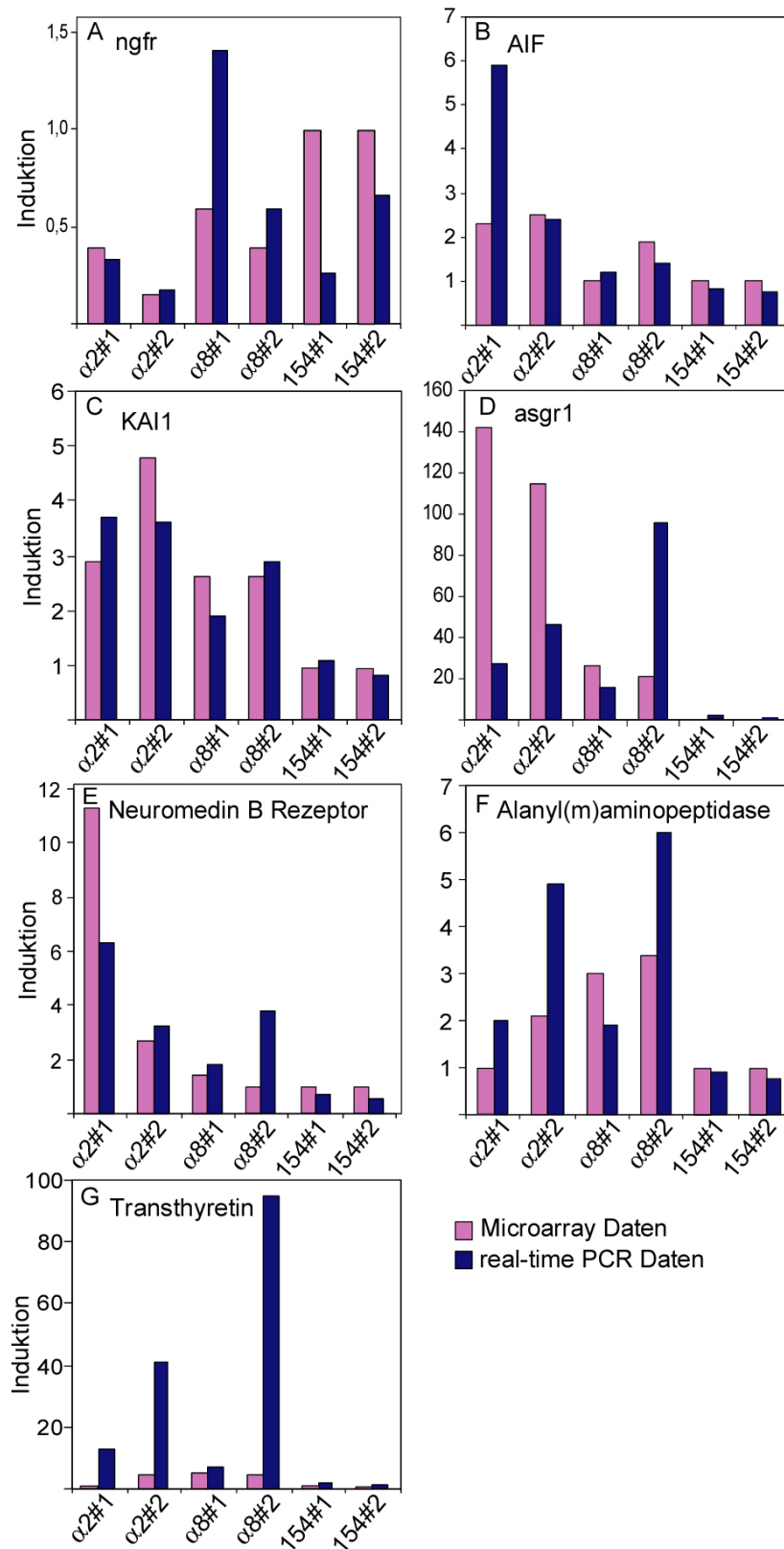


Abbildung 22: Überprüfung von sieben Zielgen-Kandidaten aus der Microarray Analyse mit real time RT-PCR. RNA wurde aus Zellen isoliert, die 24 Stunden mit 50 ng/ml Tetracyclin induziert worden waren. Die RNA entsprechender nicht-induzierter Zellen diente als Referenz für die Berechnung der Induktion. Für die real time PCR wurden Assays-on-demand (Applied Biosystems) mit TaqMan Sonden verwendet. Die Balkendiagramme zeigen die Microarray Daten und die real time RT-PCR Daten der einzelnen Gene für jede analysierte Zelllinie.

7.5 Nachweis des AIF Proteins in Flp-In T-REx INS-1 Zellen

Um die Lokalisation und Regulation von AIF auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde das Protein immunologisch detektiert.

Immunfluoreszenzanalysen zeigen in unbehandelten HNF4 α 2 exprimierenden Zellen und in den entsprechenden induzierten Zellen nach 48 Stunden punktförmige Signale im Cytoplasma, übereinstimmend mit einer mitochondrialen Lokalisation von AIF (Abb. 23A). In den induzierten Zellen ist das Signal intensiver als in den nicht-induzierten, was auf eine höhere AIF-Proteinmenge bei Expression von HNF4 α 2 hindeutet. Eine für die Induktion von Apoptose notwendige Abgabe von AIF in das Cytosol, sichtbar durch eine gleichmäßige statt körnige Fluoreszenz, kann jedoch nicht beobachtet werden. Auch eine ebenfalls im Falle der Apoptosevermittlung durch AIF zu erwartende verstärkte nukleäre Lokalisation des Proteins in den HNF4 α 2 exprimierenden Zellen konnte nicht festgestellt werden. In einzelnen Zellen, die auch im Phasenkontrastbild als bereits stark zerstört zu erkennen sind, kann eine gleichmäßige Verteilung von AIF in der gesamten Zelle beobachtet werden (s. schwarze Pfeile in Abb. 23A). Dies tritt jedoch bei induzierten und nicht-induzierten Zellen in gleichem Maße auf.

Eine Immunoblot Analyse von Gesamtzellextrakten zeigt 24 Stunden nach Induktion der HNF4 α 2 Expression eine Erhöhung der AIF-Proteinmenge in der Zelllinie HNF4 α 2#1 im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen (Abb. 23B). Für die Zelllinie HNF4 α 2#2 konnte jedoch kein Unterschied in der Proteinmenge nachgewiesen werden (Abb. 23B).

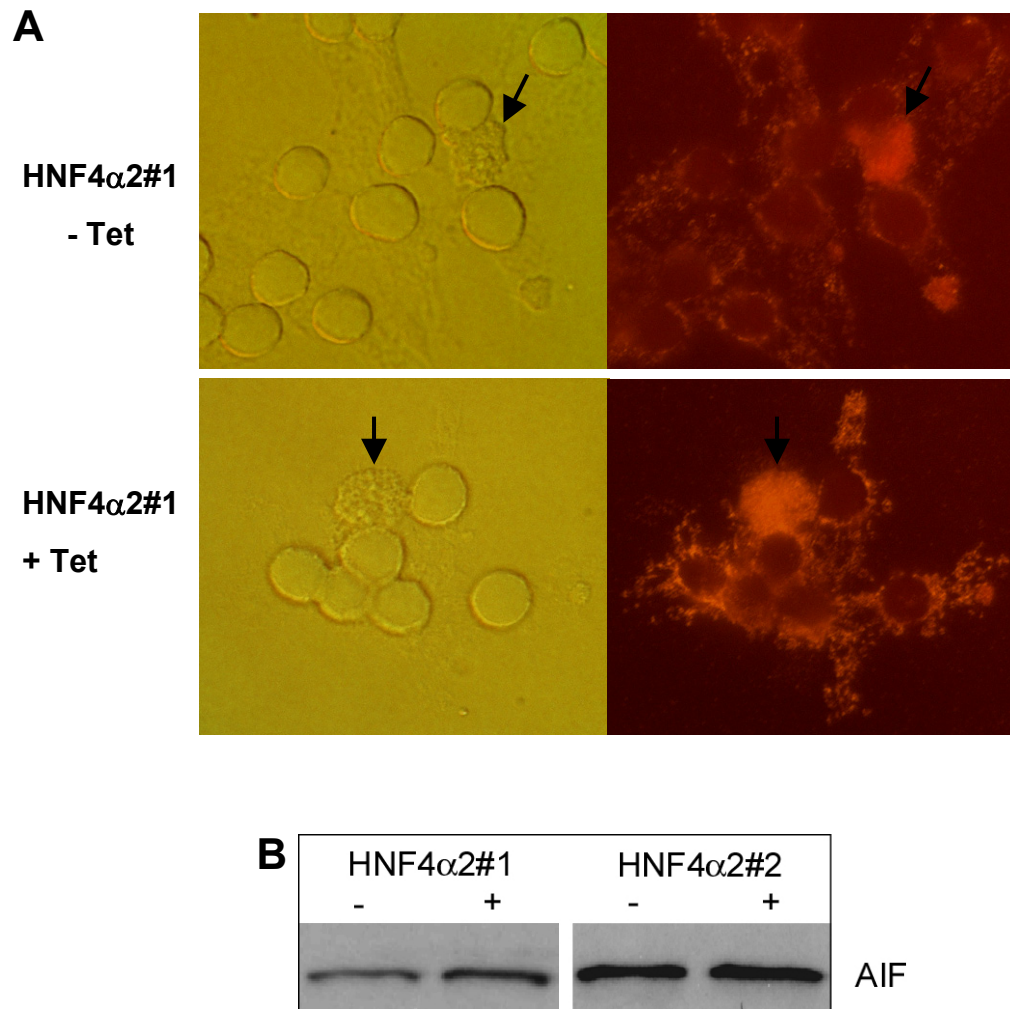


Abbildung 23: Nachweis des AIF Proteins in INS-1 FLP-In T-REx HNF4 α 2 Zellen. A) Immunfluoreszenz Analyse in INS-1 FLP-In T-REx HNF4 α 2#1 Zellen nach 48 Stunden ohne (-Tet) oder mit (+Tet) Induktion der HNF4 α 2 Expression durch Zugabe von 50 ng/ml Tetracyclin. Links sind Phasenkontrastaufnahmen und rechts die zugehörigen Fluoreszenzbilder zu sehen, aufgenommen mit einer Integrationszeit von 7800s. Verwendet wurde ein α -AIF Antikörper und ein Cy3-gekoppelter Zweitantikörper. Die Pfeile weisen auf zerstörte Zellen hin, in denen AIF im Gegensatz zu intakten Zellen auch im Zellkern lokalisiert ist. B) Immunoblotanalyse von Gesamtzellextrakten aus unbehandelten und mit 50 ng/ml Tetracyclin 48 h induzierten INS-1 FLP-In T-REx HNF4 α 2 Zellen. Es wurden 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Zur Detektion wurde ein anti-AIF Antikörper eingesetzt. Da die Detektion der beiden Zelllinien auf verschiedenen Blots erfolgte sind die Signalintensitäten nicht vergleichbar.

8 Vermitteln die Zielgene KAI1 oder AIF die apoptotischen und antiproliferativen Effekte von HNF4 α ?

8.1 Etablierung stabiler FLP-In T-REx INS-1 Zelllinien zur konditionellen Expression von KAI1 und AIF

Um zu untersuchen, ob KAI1 oder AIF die apoptotischen und antiproliferativen Effekte von HNF4 α vermitteln, wurden je zwei unabhängige Zelllinien für die konditionelle Expression der entsprechenden Gene unter Verwendung der Stammzelllinie FLP-In T-REx INS-1 1-1.2 hergestellt. Die verwendeten Konstrukte, humanes KAI1 und AIF der Maus

(Abb. 24) wurden in den Vektor eingeführt, der ihre Flp-Rekombinase vermittelte Integration am FRT-Lokus ermöglicht.

Abbildung 25A zeigt die relative Transkriptmenge von humanem KAI1 in den beiden Zelllinien KAI1#1 und KAI1#2, in unbehandelten Zellen (-) oder 24 Stunden nach Induktion der KAI1 Expression mit 50 ng/ml Tetracyclin (+). Die Messung erfolgte mittels real time RT-PCR, unter Verwendung eines TaqMan-Assays spezifisch für humanes KAI1. Es ergibt sich eine 6,1-fache bzw. 5,2-fache Induktion der hKAI1 Expression für die Zelllinien KAI1#1 bzw. KAI1#2.

Wie auch bei den vorherigen Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien angedeutet, wird in den KAI1 Zelllinien auch im nicht-induzierten Zustand eine geringe Menge des Transgens exprimiert, wie man an der gemessenen Transkriptmenge in den nicht induzierten Zellen sieht (Abb. 25A). In der zur Kontrolle eingesetzte Flp-In T-REx INS-1 Zelllinie H1luc#1, die keine humanes KAI1 DNA enthält (s. Kap. III.8.5), kann hingegen nichts detektiert werden. Abbildung 25B zeigt eine Immunoblot-Analyse der Tetracyclininduktion von AIF. Das induzierte AIF-EGFP Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kD kann leicht von dem endogenen AIF mit etwa 61 kD unterschieden werden. Ein Grund für das im Vergleich zum endogenen Protein schwache Signal des induzierten AIF könnte sein, dass der verwendete polyklonale anti-AIF Antikörper gegen den C-Terminus von AIF gerichtet ist, an den beim Fusions-Konstrukt das EGFP angehängt ist. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigt 24 Stunden nach Induktion der AIF-EGFP Expression in AIF#1 Zellen eine deutliche GFP-Fluoreszenz, die zeigt, dass das Protein in über 90 % der Zellen synthetisiert wird (Abb. 25C). Die Lokalisation des induzierten Proteins (punktförmigen Signale im Cytoplasma) stimmt mit der des endogenen Proteins (s. Abb. 23A) überein.

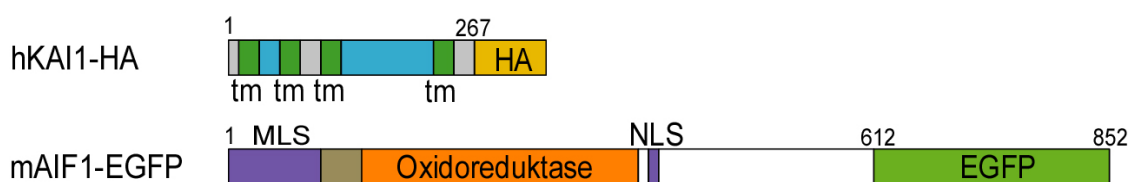


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der eingesetzten KAI1 (Schoenfeld et al., 2004), und AIF (Susin et al., 1999) Konstrukte. Zur Detektion besitzt das humane KAI1 eine HA-Domäne, das AIF aus der Maus wird als Fusionsprotein mit EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) gebildet. Es wurden zwei unabhängige Zelllinien für jedes Konstrukt etabliert. tm: Transmembrandomäne, MLS: mitochondriale Lokalisierungssequenz, NLS: nukleare Lokalisierungssequenz

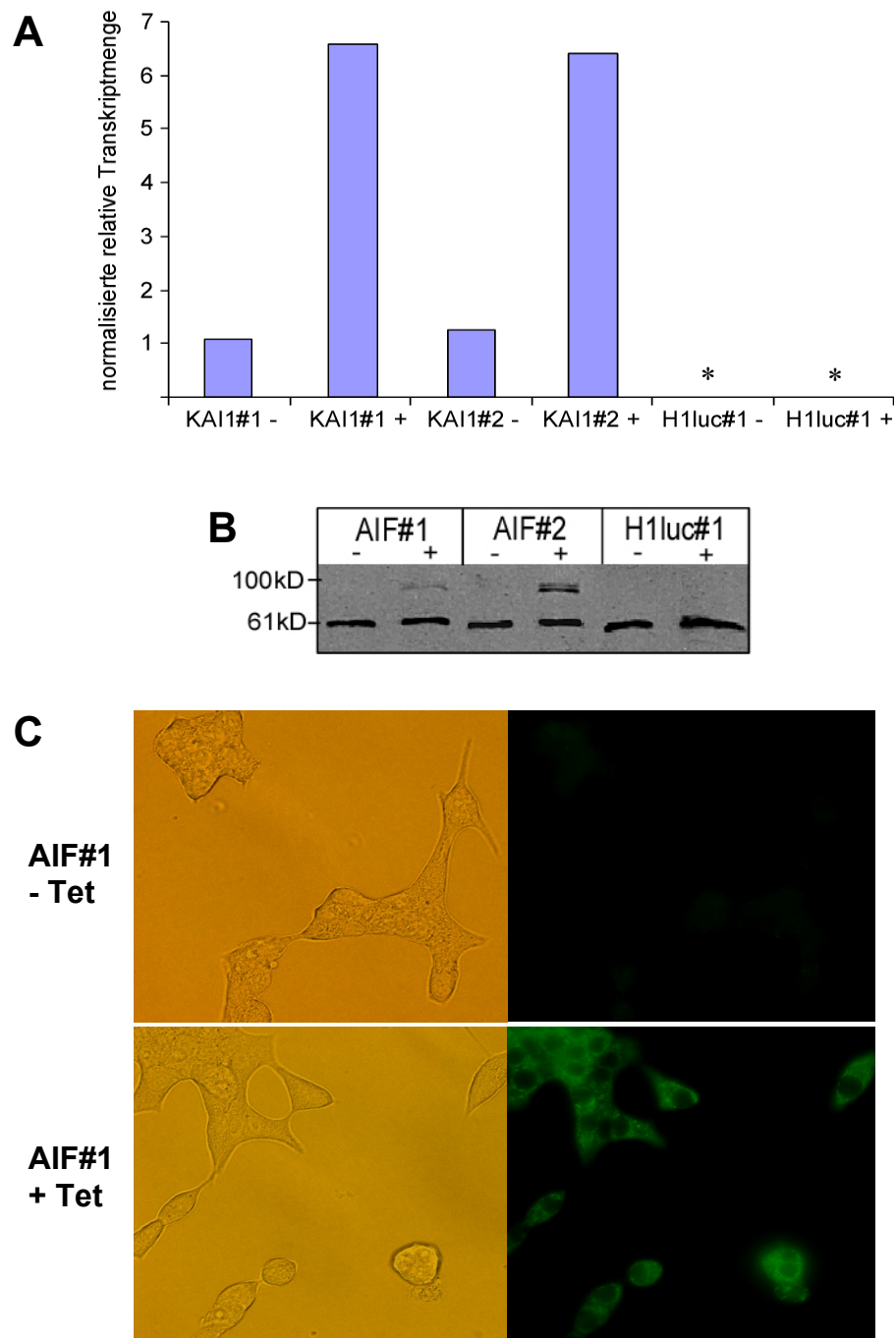


Abbildung 25: Induktion der INS-1 Flp-In T-Rex Zelllinien zur Expression von KAI1 und AIF. A) Real time RT-PCR mit einer für humanes KAI1 spezifischen TaqMan Sonde zur Messung der nach 24 Stunden mit 50 ng/ml Tetracyclin induzierten hKAI1 Expression in den Zelllinien INS-1 Flp-In T-Rex AIF#1 und #2. Das Diagramm zeigt die gemessene relative Transkriptmenge. Auch nicht-induziert (-) exprimieren die Zelllinien eine geringe Menge des Transgens während in der zur Kontrolle eingesetzten INS-1 Flp-In T-Rex Zelllinie H1luc#1 kein humanes KAI1 nachgewiesen werden kann. *auch nach >20 Zyklen mehr als bei KAI (-) kein Signal B) Immunoblotanalyse von Gesamtzellextrakten unbehandelter (-) und 24 Stunden mit 50 ng/ml Tetracyclin induzierter (+) INS-1 Flp-In T-Rex AIF#1 und AIF#2 Zellen. Es wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen, die Detektion erfolgte mit einem α-AIF Antikörper. Die Bande bei 61 kD zeigt das endogene AIF, während bei etwa 100 kD das AIF-EGFP Fusionsprotein detektiert wird. C) Phasenkontrastbilder (links) und die entsprechenden Fluoreszenzbilder (rechts) nicht-induzierter (-Tet) und 24 h mit 50 ng/ml Tetracyclin induzierter (+Tet) INS-1 Flp-In T-Rex AIF#1 Zellen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Integrationszeit von 2400 s aufgenommen.

8.2 Morphologische Veränderungen von INS-1 Zellen nach Expression von KAI1 und AIF

Um festzustellen, ob KAI1 oder AIF die Effekte von HNF4 α auf INS-1 Zellen vermitteln, wurde zunächst die Morphologie der INS-1 Zellen bei Expression der beiden Gene untersucht. 24 Stunden nach Induktion der KAI1 Expression runden sich die INS-1 Zellen ab, sie werden kleiner und beginnen in 3-dimensionalen Zellhaufen zu wachsen (Abb. 26). Die Expression von AIF hat weniger deutliche Auswirkungen auf die INS-1 Zellen. Nach 24 Stunden wirken sie etwas kleiner als die entsprechenden nicht-induzierten Zellen und erscheinen häufig bipolar (s. Abb. 25C). Weder nach der Expression von KAI1 noch nach der Expression von AIF sind nach bis zu sechs Tagen verstärkt tote Zellen sichtbar.

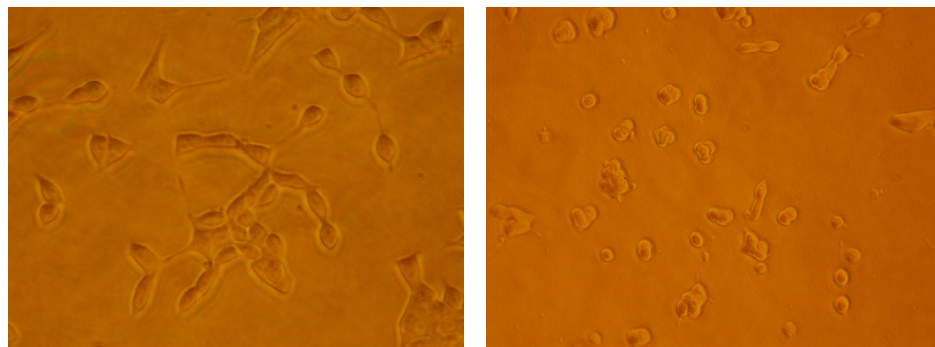


Abbildung 26: Phasenkontrastbilder nicht-induzierter (links) und induzierter INS-1 Flp-In T-REx KAI1#1 Zellen. Die Induktion der hKAI1 Expression erfolgte 24 Stunden mit 50 ng/ml Tetracyclin.

8.3 Auswirkungen der Expression von KAI1 und AIF auf das Wachstum von INS-1 Zellen

Um zu untersuchen, ob KAI1 oder AIF die Hemmung des Wachstums von INS-1 Zellen durch HNF4 α vermitteln, wurde der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Induktion der Expression der beiden Gene mittels MTS Assay untersucht. Wie Abbildung 27 zeigt, sinkt einen Tag nach Induktion der Expression von KAI1 der Anteil der vitalen Zellen auf etwa 80 - 85 % in Relation zu den entsprechenden nicht induzierten Zellen. Im weiteren Verlauf, nach zwei bis sechs Tagen, kommt es zu keiner weiteren Abnahme der relativen Zellzahl der induzierten Zellen.

Nach Induktion der Expression von AIF sinkt der Anteil der aktiven Zellen stetig, jedoch in weit geringerem Ausmaß als bei Expression von HNF4 α 2 (s. Abb. 27) und erreicht nach sechs Tagen 60 % (AIF#1) bzw. 30 % (AIF#2). Diese unterschiedlichen Werte korrelieren mit der Analyse der Induktion dieser Zelllinien im Western Blot (Abb. 25B), in dem das Signal der AIF#2 Zelllinie nach Induktion deutlich stärker ist als das entsprechende Signal der Zelllinie AIF#1. Im Vergleich zu der dominant-negativen HNF4 α Mutante C106R hat

sowohl die Expression von KAI1 als auch von AIF einen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum der INS-1 Zellen, mit der viel stärkeren Wirkung von HNF4 α 2 ist er jedoch bei beiden nicht vergleichbar.

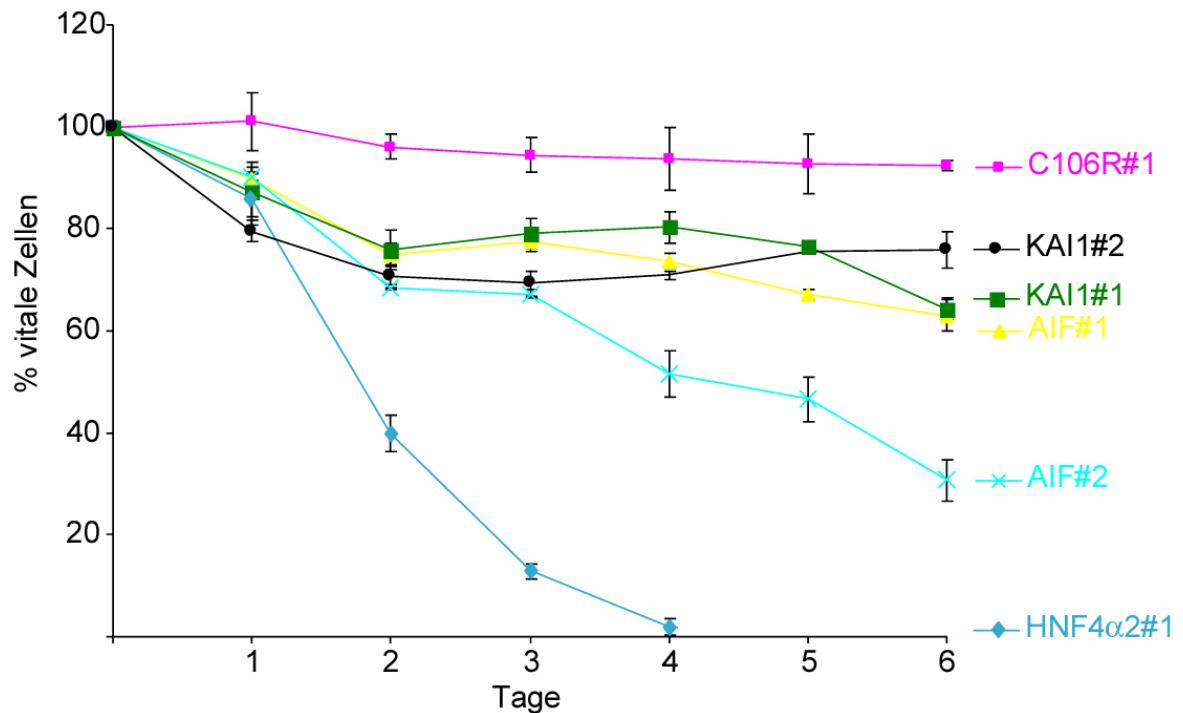


Abbildung 27: MTS Assay zur Bestimmung des Zellwachstums KAI1 und AIF exprimierender INS-1 Flp-In T-REx Zellen. Die angegebenen Zelllinien wurden 1bis 6 Tage mit 50 ng/ml Tetracyclin induziert und die relative Anzahl vitaler Zeller mittels MTS Assay bestimmt. Die angegebenen Prozente beziehen sich auf die entsprechenden unbehandelten Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Werten an.

8.4 Auswirkung der Expression von KAI1 und AIF auf die Caspase 3/7 Aktivität

Da nach der Induktion von KAI1 und AIF keine toten Zellen sichtbar sind, sollte eine mögliche Induktion von Apoptose durch den sehr sensitiven luminometrischen Caspase 3/7 Assay überprüft werden. Wie in Abbildung 28 gezeigt, konnte jedoch weder nach Induktion von KAI1 noch von AIF innerhalb von drei Tagen eine Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität nachgewiesen werden, ebensowenig wie für die Mutante C106R.

Dies bedeutet, dass weder KAI1 noch AIF alleine die apoptotische Wirkung von HNF4 α vermitteln. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sie gemeinsam oder in Kombination mit anderen regulierten Faktoren an den Effekten beteiligt sind.

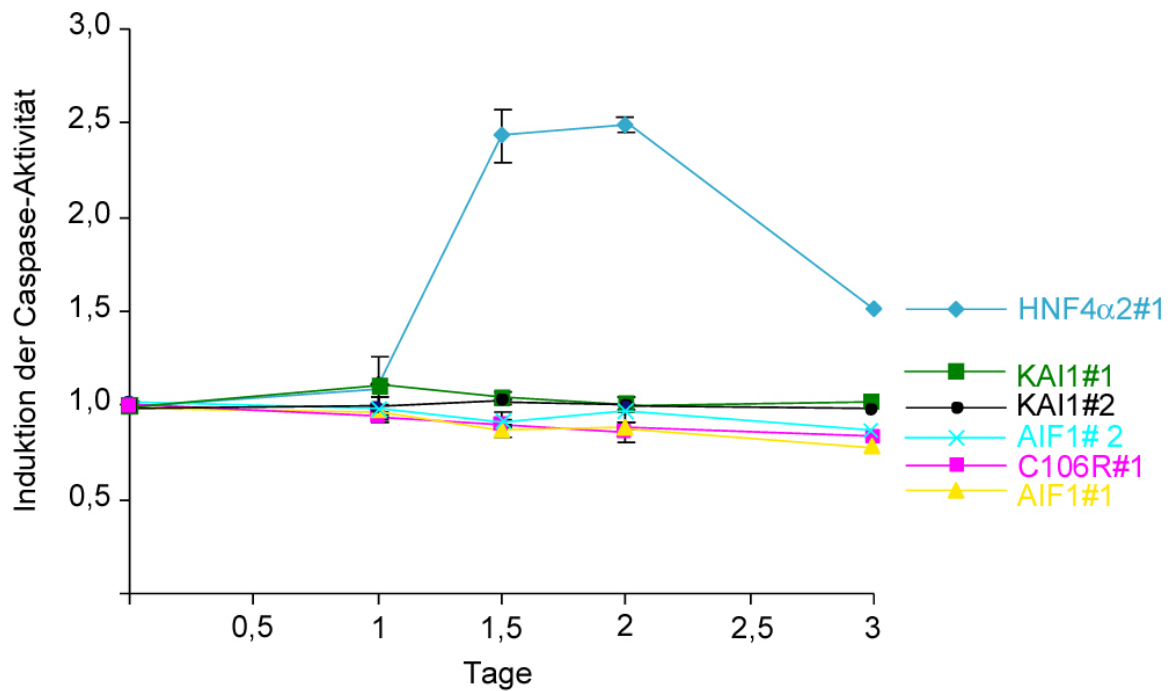


Abbildung 28: Bestimmung der relativen Caspase-Aktivität. Die angegebenen INS-1 Flp-In T-REx Zelllinien wurden 1 bis 3 Tage mit 50 ng/ml Tetracyclin induziert und anschließend die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mittels des luminometrischen Caspase-Glo™ 3/7 Assays (Promega) gemessen. Die angegebene Induktion bezieht sich auf die entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei unabhängigen Werten an.

8.5 Einsatz von siRNA zur Verminderung der Expression von endogenem KAI1 und AIF

Parallel zu den in Kapitel III.8.4 beschriebenen Expressionsexperimenten sollte eine mögliche Rolle von KAI1 und AIF bei der Vermittlung der apoptotischen und antiproliferativen Effekte von HNF4α durch die Hemmung der Expression der beiden Gene untersucht werden. Die nach Expression von HNF4α2 beobachtete Steigerung der Genaktivität von KAI1 und AIF sollte vermindert und die möglichen Effekte auf Zellproliferation und Apoptose untersucht werden. Dazu sollten siRNAs (short interfering RNAs) eingesetzt werden, 21-25 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs, die die Repression der Aktivität des korrespondierenden Genes in Säugetierzellen ermöglichen (Elbashir et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden siRNA Kassetten verwendet. Die Kassetten sind PCR Produkte, die aus einem Promoter (H1 oder U6) und einer Terminierungssequenz bestehen, die eine DNA Sequenz einrahmen, die für eine Haarnadel-RNA kodieren (s. Abb. 29A). Nach einer Transfektion in Zellen wird die DNA exprimiert und die gebildete Haarnadel-RNA von zellulären Mechanismen in eine 19-22 Nukleotide lange doppelsträngige siRNA umgewandelt.

Um eine stabile und effiziente Expression der siRNA zu ermöglichen, wurden stabile Flp-In T-REx INS-1 Zelllinien mit konditioneller Expression von HNF4 α 2 und konstitutiver Expression einer siRNA etabliert. Dazu wurde der in Kapitel III.2 beschriebene pcDNA5/FRT/TO Vektor, der HNF4 α 2 als GOI enthält, von Sabine Senkel so modifiziert, dass die siRNA kodierende DNA einschließlich des Promotors und der Terminierungssequenz als MluI - HindIII Fragment (s. Abb.29A) eingefügt werden kann. Abbildung 29B zeigt den als FRmH4si bezeichneten Ausgangsvektor mit integriertem H1 oder U6 Promoter (P, grüner Pfeil) und der für die siRNA kodierenden Sequenz (grün).

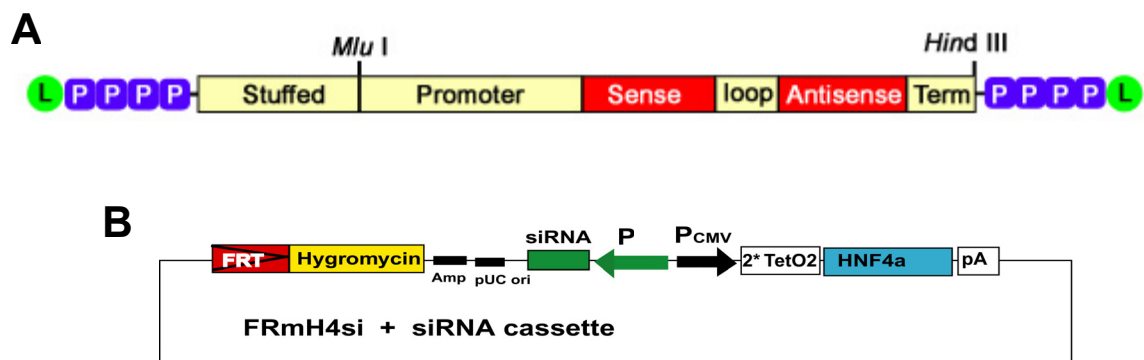


Abbildung 29: Herstellung der FRmH4si Vektoren zur stabilen Synthese von siRNA in INS-1 Flp-In T-REx Zellen. A) Schematische Darstellung der siRNA Kasse, die einen H1 oder U6 Promotor enthalten. Die für die siRNA kodierende DNA Sequenz wird in Sense und Antisense Richtung eingebaut und führt bei Expression zur Bildung einer Haarnadel-RNA die von zellulären Mechanismen in siRNA umgewandelt wird. B) Schematische Darstellung des als FRmH4si bezeichneten modifizierten pcDNA5/FRT/TO Vektors, der HNF4 α 2 als GOI enthält. Durch das eingeführte Verbindungsstück kann die für die siRNA kodierende DNA mit Promotor und Terminierungssequenz als MluI - HindIII Fragment direkt eingefügt werden.

Unterschiedliche siRNA Sequenzen weisen stark unterschiedliche Effizienzen bei der Repression der Aktivität des korrespondierenden Genes auf, wobei bereits einige der dafür verantwortlichen Parameter bekannt sind. Für diese Arbeit wurden für KAI1 fünf und für AIF drei verschiedene siRNA Sequenzen eingesetzt. Diese wurde mit Hilfe des siRNA Design Werkzeugs von GenScript auf deren Internetseite (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) ermittelt. Als Kontrolle wurde außerdem eine von GenScript etablierte Sequenz zur Repression von Luciferase verwendet, unter Kontrolle des H1 wie auch des U6 Promotors. Die als MluI - HindIII Fragmente in den FRmH4si Vektor eingefügten Konstrukte wurden sequenziert und für jedes zwei unabhängige Zelllinien etabliert.

In den Zellen wurde die Expression von HNF4 α 2 induziert und nach 24 Stunden die relative Transkriptmenge von KAI1 bzw. AIF mit Hilfe der real time RT-PCR in unbehandelten und induzierten Zellen gemessen. Abbildung 30A zeigt, dass die Induktion von KAI1 durch HNF4 α 2 bereits in den drei Kontrollzelllinien H1luc#1, H1luc#2 und

U6luc#1, die siRNA Konstrukte für Luciferase integriert haben, eine starke Streuung von 2-fach bis 3,5-fach zeigt. Eine im Vergleich dazu signifikante Verringerung der Induktion kann in keiner der Zelllinien, die siRNA-Konstrukte für KAI1 enthalten, nachgewiesen werden. Das gleiche Resultat ergibt die real time RT-PCR Analyse der AIF Transkriptmenge (Abb. 30B).

Um festzustellen, ob die verwendeten siRNA Sequenzen nicht wirksam sind, wurde die etablierte Kontroll siRNA gegen Luciferase in einem Luciferase Assay geprüft. Dabei wurden verschiedene INS-1 Flp-In T-REx FRmH4si Zelllinien mit einem Luciferase Expressionsvektor transfiziert und nach 20 Stunden die Enzymaktivität im Luminometer gemessen. Eine Normalisierung auf die dafür eingesetzte Proteinmenge erfolgte durch eine Bradford Bestimmung. Abbildung 30C zeigt, dass die drei Zelllinien, die für die Luciferase siRNA kodieren, H1luc#1, H1luc#2 und U6luc#1, im Vergleich zu den drei Zelllinien, die andere siRNA Konstrukte enthalten (H1aif d#2, H1kai d#3, U6kai c#1) keine Verringerung der Luciferase-Aktivität und damit keine Repression des Luciferase Gens aufweisen. Da die Effizienz dieser siRNA Sequenz zur Repression der verwendeten Luciferase DNA etabliert ist, muss es einen anderen Grund als die fehlende Wirksamkeit der siRNA Sequenzen für die mangelnde Funktion des FRmH4si Systems in den INS-1 Flp-In T-REx Zellen geben.

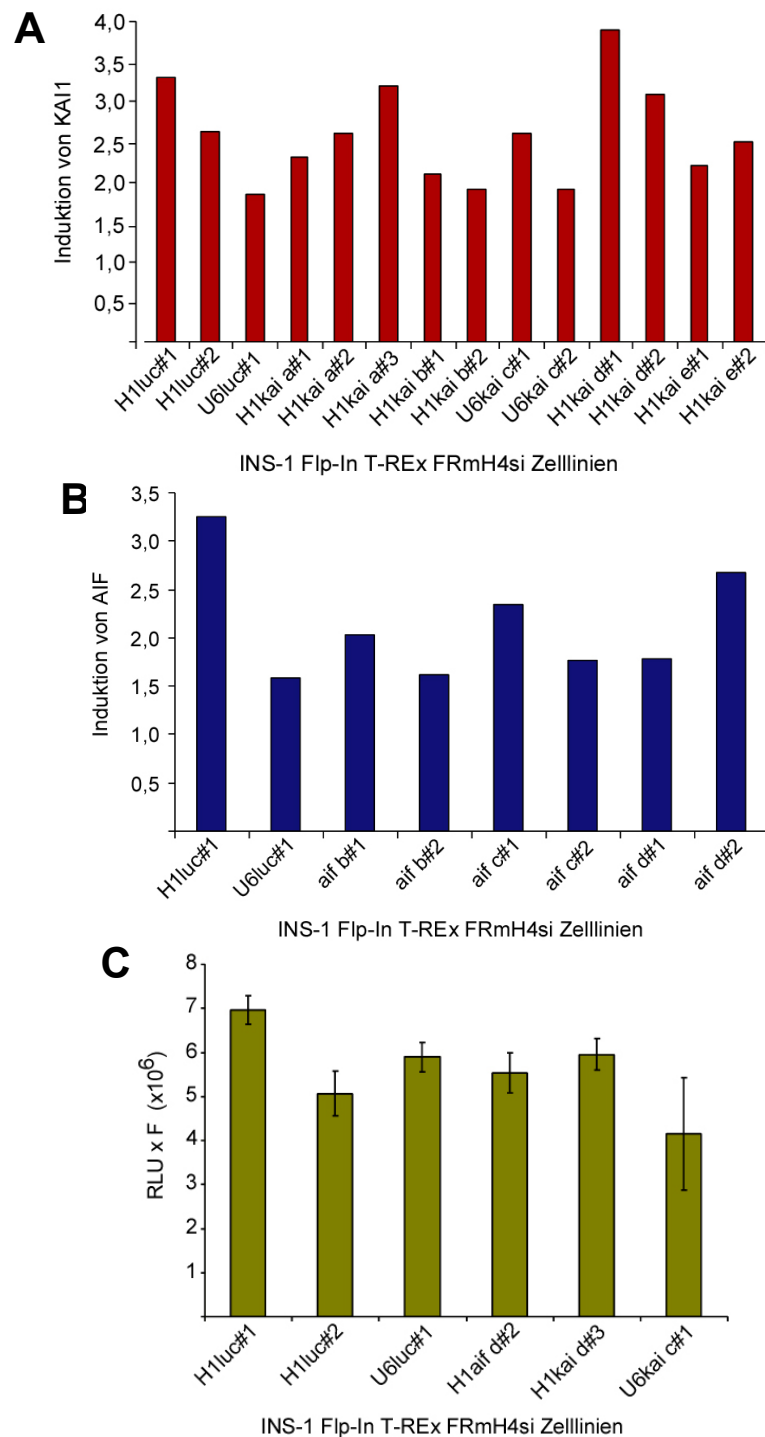


Abbildung 30: Untersuchung der Aktivität der siRNA in den INS-1 Flp-In T-REx FRmH4si Zelllinien. A) Bestimmung der KAI1 Induktion in INS-1 Flp-In T-REx FRmH4si Zelllinien. In den angegebenen Zelllinien wurde die Expression von HNF4 α 2 24 Stunden durch Zugabe von 50 ng/ml Tetracyclin induziert und anschließend die KAI1 RNA mittels real time RT-PCR unter Verwendung spezifischer TaqMan Sonden quantifiziert. Die fachen Induktionen beziehen sich auf die RNA der entsprechenden nicht-induzierten Zellen. Zur Normalisierung wurde die gemessene Menge 18S RNA verwendet. B) Die Bestimmung der AIF Induktion in den aufgeführten INS-1 Flp-In T-REx FRmH4si Zelllinien erfolgte wie unter A beschrieben mit AIF-spezifischen TaqMan Sonden. C) Die angegebenen INS-1 Flp-In T-REx FRmH4si Zelllinien wurden mit 2 μ g des Luciferase-Expressionsvektors CMV-luc transfiziert und nach 20 Stunden die Luciferase Aktivität luminometrisch gemessen. Die für die Messung eingesetzte Proteinmenge wurde mit der Bradford-Methode bestimmt und die Ergebnisse entsprechend normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Werten an.

IV DISKUSSION

1 HNF4 α hemmt das Wachstum von INS-1 Zellen in verschiedenen Expressionssystemen

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α ist bisher besonders für die Regulation von Genen bekannt, die an den verschiedensten metabolischen Vorgängen sowie an der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Leberzellen-Phänotyps beteiligt sind. Zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren kontrolliert er auch wichtige Funktionen der β -Zellen des Pankreas und ist entscheidend an deren Glukosemetabolismus und der glukoseabhängigen Insulinsekretion beteiligt, was auch durch die Tatsache deutlich wird, dass heterozygote Mutationen im menschlichen HNF4 α Gen zu einer vererblichen Form von Diabetes mellitus führen. Frühere Arbeiten unserer Gruppe zeigten, dass HNF4 α einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von INS-1 und auch HEK293 Zellen hat (Lausen, 2001). INS-1 Zellen leiten sich von einem Insulinoma der Ratte ab (Asfari et al., 1992). Sie sind differenziert und zur Insulin-Sekretion fähig und stellen daher ein wertvolles Modell für die schwer zugänglichen β -Zellen des Pankreas dar.

1.1 Doxycyclin-induzierte Expression von HNF4 α in INS-r3 Zellen

Der negative Effekt auf das Wachstum von INS-1 Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit zunächst mit von Wang et al. etablierten stabilen INS-1 Klonen bestätigt werden. Diese Klone ermöglichten die induzierte Expression von HNF4 α 1 bzw. einer dominant-negativen HNF4 α Mutante (Wang et al., 2000) in über 90 % der Zellen (Abb. 3). Vier Tage nach Induktion der Expression von HNF4 α 1 sank die Zellzahl auf 45 % im Vergleich zu den entsprechenden nicht-induzierten Zellen, die Expression der Mutante führte zu einer Abnahme auf 87 % (Abb. 4). Allerdings zeigte eine Immunfluoreszenzanalyse, dass nur wenige Zellen Insulin exprimieren (Abb. 5). Damit fehlt den Klonen eine wichtige β -Zell typische Eigenschaft und ihr Wert als Modell für diesen insulinsekretierenden Zelltyp ist in Frage gestellt. Hinzu kommt, dass die beiden Zellklone nicht optimal vergleichbar sind, da das Transgen in unterschiedlicher Kopienzahl und an verschiedenen Loci integriert sein kann.

1.2 INS-1 T-REx Flp-In Zelllinien

Eine bessere Möglichkeit zur konditionellen Expression stellt das neuartige Flp-In T-REx System dar (Abb. 6), das in unserer Gruppe für die INS-1 Zellen etabliert wurde. Die INS-1 Flp-In T-REx Zellen erlauben die induzierte Transgenexpression und besitzen eine Reihe

von Vorteilen gegenüber den herkömmlichen Systemen für die stabile Expression. Die Flp-Rekombinase vermittelte Integration des Transgens erfolgt stets als Einzelkopie und an den gleichen genomischen Locus, was eine viel bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien ermöglicht, als bei Standard-Protokollen zur Etablierung stabiler Klone. Die Herstellung der Zelllinien ist auch wesentlich einfacher und schneller und wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um neben zwei unabhängigen Zelllinien zur Expression von HNF4 α 2 auch jeweils zwei zur Expression der vom alternativen Promotor P2 abgeleiteten Isoform HNF4 α 8, der MODY Mutante R154X und der künstlichen dominant-negativen Mutante C106R, sowie für GFP zu etablieren. Alle HNF4 α Derivate exprimierenden Zelllinien zeigen eine Transgeninduktion von mehr als 90 % (Abb. 8), wobei die Menge an synthetisiertem Protein von der Konzentration des zur Induktion verwendeten Tetracyclins abhängig ist (Abb. 10B). Die nach Induktion mit 50 ng/ml Tetracyclin synthetisierte Proteinmenge ist bei allen HNF4 α -Derivaten vergleichbar, nur die Menge der Mutante R154X ist in beiden unabhängigen Zelllinien geringer (Abb. 10A). Dies kann auf eine geringere Stabilität des stark verkürzten Proteins als Folge von Konformationsänderungen zurückzuführen sein. Eine geringere Stabilität der RNA ist als Grund hingegen nicht wahrscheinlich, da die Mutante R154X nur eine Punktmutation aufweist, die zu einem Abbruch der Translation jedoch nicht zu einer Verkürzung der RNA führt. Für Konformationsunterschiede zwischen HNF4 α und R154X auf Proteinebene spricht auch die Tatsache, dass die Zellen für die Immunfluoreszenz anders fixiert werden müssen, um einen Nachweis von R154X zu ermöglichen, als die anderen HNF4 α -Derivate. Es zeigt sich außerdem, dass die einzelnen Zelllinien zwar ein sehr vergleichbares aber nicht völlig identisches Expressionsverhalten haben. Abbildung 10B zeigt z.B., dass für die Zelllinie HNF4 α 8#1 eine Induktion mit 100 ng/ml Tetracyclin zu einer Steigerung der HNF4 α 8 Proteinmenge führt, während für die Zelllinien HNF4 α 2#1 und HNF4 α 8#2 bei einer Induktion mit 50 ng/ml Tetracyclin das Maximum der induzierten Proteinsynthese erreicht zu sein scheint. Die Wachstumskurven in Abbildung 14B zeigen auch Unterschiede beim Zellwachstum der unbehandelten Zelllinien.

Vier Tage nach Induktion der Expression von HNF4 α 2 sind kaum noch vitale Zellen vorhanden (Abb. 13), während die Expression von HNF4 α 8 nur zu einer Verringerung der relativen Zellzahl auf 40 % führt (Abb. 14A). Der unterschiedlich starke Effekt kann auf ein geringeres Transaktivierungspotential der P2 Isoform hindeuten, das mit dem Fehlen der Aktivierungsfunktion AF1 zusammenhängen kann, die für die synergistische Interaktion mit Kofaktoren nötig ist (Torres-Padilla et al., 2002). Der Effekt ist jedoch bei

beiden Isoformen spezifisch, da die Expression der beiden Mutanten R154X und C106R keinen Einfluß auf die Zellzahl zeigt (Abb. 13 und 14A).

Das unterschiedliche Ausmaß der HNF4 α -abhängigen Hemmung des Zellwachstums, das in dem Klon von Wang et al. beobachtet wurde, könnte neben der Tatsache, dass es sich um unterschiedliche Expressionssysteme und unterschiedlich selektionierte Klone mit Transgenintegration an unterschiedlich aktiven Loci handelt, auch darauf zurückzuführen sein, dass die Isoform HNF4 α 1 verwendet wurde. In den Flp-In T-REx Zellen hingegen wurde die Variante HNF4 α 2 eingeführt, die sich durch eine Insertion von 10 Aminosäuren in der F-Domäne von HNF4 α 1 unterscheidet (Abb. 7), was zu einer verstärkten Transaktivierung führen kann (Sladek et al., 1999).

Der geringe aber signifikante Effekt der dominant-negativen Mutante von Wang et al. könnte auf eine generelle Belastung der Zellen durch Induktion des Expressionssystems zurückzuführen sein. Dies läßt sich nicht ausschließen, da es keine weiteren Kontrollen mit neutralen Konstrukten gab. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Ausschaltung des endogenen HNF4 α Proteins ebenfalls das Wachstum von β -Zellen negativ beeinflusst, wie es für HNF1 α gezeigt wurde (Wobser et al., 2002). Der Mutante fehlen die ersten 111 Aminosäuren, wodurch die DNA-Bindungsdomäne komplett wegfällt und so mit dem endogenen Protein Heterodimere ohne die Fähigkeit zur DNA-Bindung entstehen können (Fraser et al., 1997). Allerdings ergibt sich dann die Frage, warum die Mutante C106R, die ebenfalls als dominant-negativ beschrieben wird (Taylor et al., 1996), keinen Effekt auf das Zellwachstum zeigt. Bei dieser Mutante ist nur eine Aminosäure ausgetauscht, dadurch wird aber das Zink-Finger Motiv zerstört und so ebenfalls die DNA-Bindungsfähigkeit ausgeschaltet. Alle anderen Funktionen des Proteins, auch eventuelle noch nicht bekannte Protein-Protein Wechselwirkungen bleiben bei dieser Mutante jedoch bestehen und auch die Translokation in den Kern ist gegeben.

2 HNF4 α beeinflusst die Morphologie von INS-1 Zellen

Die Expression von HNF4 α führt zu deutlichen morphologischen Veränderungen der INS-1 Zellen, die jedoch für die beiden Isoformen qualitativ unterschiedlich, und bei HNF4 α 8 weniger gravierend als bei HNF4 α 2 sind. Zwei Tage nach Induktion der Expression von HNF4 α 2 erscheinen die Zellen unter dem Mikroskop platt und polygonal und zeigen eine extreme Vakuolisierung, die die Zerstörung von Zellstrukturen und Zellfunktionen anzeigt (Abb. 11). Es könnte sich um eine Begleiterscheinung der Apoptose handeln oder auch um sogenannte Stress-Granula (Kedersha and Anderson, 2002; Cande et al., 2004). Eine

weitere Möglichkeit wäre die Akkumulation von Lipid-Tröpfchen, Vesikeln in denen überschüssige Fette hauptsächlich in Form von Triglyceriden gespeichert werden. Während dies in Adipocyten ein normaler Vorgang ist, tolerieren die Zellen anderer Gewebe die Akkumulation von Lipiden nur in begrenztem Ausmaß und besonders auf die β -Zellen des Pankreas wirken hohe Lipidkonzentrationen toxisch, führen zu Fehlfunktionen und Zelltod (zusammengefasst in Leonardi et al., 2003). Eine Untersuchung mit Ölrot O, das neutrale Lipide orange bis rot färbt, zeigt tatsächlich, dass einen Tag nach der Induktion der Expression von HNF4 α 2 die Akkumulation von Lipiden in Tröpfchen im Cytoplasma stark zunimmt, während die Expression der MODY Mutante R154X keinen Effekt hat (Abb. 12). Die beobachtete Vakuolisierung kann also zumindest teilweise auf die Akkumulation von Lipiden in Lipid-Tröpfchen zurückzuführen sein. Da bekannt ist, dass HNF4 α Gene des Fett- und Glukosemetabolismus reguliert, ist eine Akkumulation von Lipiden durch eine Deregulation des Fettstoffwechsels als Folge einer erhöhten Expression von HNF4 α denkbar.

Während die Expression der Mutanten R154X und C106R keinen Einfluß auf die Morphologie der INS-1 Zellen hat, führt die Expression von HNF4 α 8 zu einem Abbruch der Zell-Zell Kontakte und zu starker Vereinzelung der Zellen (s.Abb. 11), was mit der Rolle von HNF4 α bei der Regulation der Expression von Zelladhäsions- und Zellverbindungs-Molekülen (Chiba et al., 2003) zusammenhängen könnte.

3 HNF4 α verringert die Proliferationsrate und induziert Apoptose in INS-1 Zellen

Die beobachtete Verringerung der Zellzahl nach Expression von HNF4 α im Vergleich mit nicht-induzierten Zellen könnte sowohl auf eine Verringerung der Zellproliferation als auch auf vermehrten Zelltod zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit konnte durch BrdU-Markierungsexperimente gezeigt werden, dass sowohl die Expression von HNF4 α 2, als auch mit einem verspäteten Effekt die Expression von HNF4 α 8, zu einer Verringerung der Proliferationsrate nach zwei bzw. vier Tagen führt (Abb. 15). Ob dies ein primärer Effekt von HNF4 α oder ein Sekundäreffekt der Apoptose der Zellen ist, bleibt unklar. Dass die Expression von HNF4 α 2 zu einer Zunahme von Zelltod führt, wird bereits durch mikroskopische Beobachtung und Wachstumskurven der Zellen deutlich. Bereits nach zwei, verstärkt nach drei Tagen der Expression von HNF4 α 2, sind mikroskopisch tote Zellen und Zelltrümmer erkennbar (Abb. 11). Eine Auszählung der induzierten Zellen zeigt außerdem, dass vier Tagen nach HNF4 α 2 Expression weniger Zellen vorhanden sind,

als zu Beginn ausgesät wurden (Abb. 14B). Eine Zellzyklus-Analyse mit Propidium-Iodid liefert Hinweise auf eine apoptotische Zellfraktion zwei Tage nach Induktion der HNF4 α 2 Expression (Abb. 16). Diese Methode allein erbringt allerdings keinen ausreichenden Beweis für das Auftreten von Apoptose, da es sich auch um nekrotische Zellen oder Zelltrümmer handeln könnte. Dies wird jedoch durch die Analyse der genomischen DNA ausgeschlossen, die bereits ab 36 Stunden nach Induktion der HNF4 α 2 Expression ein charakteristisches Bandenmuster, die sogenannte DNA-Leiter, zeigt, die ein sehr sicherer Nachweis für Apoptose ist (Abb. 17). Auch eine dritte Methode, die die Steigerung der Aktivität der charakteristischen Enzyme Caspase 3 und 7 misst, bestätigt die Induktion von Apoptose in INS-1 Zellen ab 36 stündiger Expression von HNF4 α 2 (Abb. 18). Für HNF4 α 8 kann im Unterschied dazu nur mit dem Caspase-Assay Apoptose nachgewiesen werden, wenn auch in weit geringerem Ausmaß als für HNF4 α 2. Da dies auch die mit Abstand die sensitivste der drei Nachweismethoden ist, reflektiert das möglicherweise die generell beobachtete schwächere bzw. langsamere Wirkung der P2 Isoform. Die Spezifität der antiproliferativen Wirkung und der Induktion von Apoptose sowie die Relevanz dieser Mechanismen für MODY wird dadurch gezeigt, dass weder die Expression von GFP noch der MODY Mutante R154X diese Effekte hervorruft. Das gilt auch für die Punktmutante C106R, womit ausgeschlossen werden kann, dass eine nicht vorhandene Proteindomäne des trunkierten R154X Proteins für die fehlende Wirkung verantwortlich ist. Dadurch kann auch ein auf Protein-Protein Wechselwirkungen beruhender Mechanismus, wie z.B. eine direkte Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen, die für den Transkriptionsfaktor C/EBP α nachgewiesen werden konnte (Wang et al., 2001), ausgeschlossen werden. Die transkriptionelle Aktivität von HNF4 α scheint vielmehr essentiell für dessen anti-proliferative und apoptotische Effekte zu sein und spezifische Zielgene müssen dabei eine Rolle spielen.

4 Microarray Analysen identifizieren Zielgene von HNF4 α in β -Zellen

4.1 Die Microarray Daten sind aussagekräftig

Die Microarray Analysen ergaben 24 Stunden nach Induktion der Transgenexpression mit 50 ng/ml Tetracyclin 257 durch HNF4 α 2 regulierte Zielgene, wobei etwa viermal mehr Gene hoch- als herunterreguliert sind (Abb. 19). Diese Tendenz findet sich bei allen in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen, auch bei denen von HNF4 α 8, und korreliert

mit der Tatsache, dass auch die meisten Veröffentlichungen eine Aktivierung von Genen durch HNF4 α beschreiben (zusammengefasst in Sladek and Seidel, 2001).

Da die MODY assoziierte Mutante R154X keine anti-proliferativen oder apoptotischen Effekte auf die INS-1 Zellen hat, könnten Zielgene der Mutante als Kandidaten für die Vermittlung dieser Effekte durch HNF4 α ausgeschlossen werden. Auch falsch positive Signale, die durch die Zugabe von Tetracyclin erzeugt wurden, können so eliminiert werden. Die Microarray Analysen von R154X ergaben jedoch nur zwei herunterregulierte Kandidaten, ein EST und das Gen für das Apolipoprotein C1, die beide nicht unter den Zielen von HNF4 α 2 oder HNF4 α 8 zu finden sind.

Viele Zielgene von HNF4 α sind bereits bekannt, hauptsächlich in der Leber. In Übereinstimmung mit den von uns gewonnenen Daten in den INS-1 Zellen handelt es sich dabei um besonders viele Gene die an metabolischen Vorgängen beteiligt sind (Sladek and Seidel, 2001). Eine kürzlich erschienene Studie identifiziert potentielle Zielgene von HNF4 α (und auch von HNF1 β und HNF6) im Pankreas durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) kombiniert mit Promotor-Microarrays (Odom et al., 2004). Dabei wird HNF4 α an eine hohe Zahl von Promotoren gebunden, an 1323 Stück, im Vergleich zu HNF1 β und HNF6 die 106 bzw. 189 Promotoren binden. Von den 1323 Genen wurde bei 1047 auch die Bindung von RNA Polymerase II nachgewiesen, was bedeutet, dass diese auch aktiv transkribiert werden. Allerdings wurden für diese Analysen aufgereinigte Zellen der Langerhansschen Inseln von menschlichen Bauchspeicheldrüsen verwendet, die neben möglichen Verunreinigungen noch drei weitere endokrine Zelltypen enthalten. Vor allem aber muss die Bindung eines Transkriptionsfaktors an einen Promotor, auch wenn es sich um aktiv transkribierte Gene handelt, nicht unbedingt eine Veränderung der Expressionsstärke dieses Genes zur Folge haben. Die Aktivität kann bereits gesättigt sein oder ein Transkriptionsfaktor kann einen anderen ersetzen ohne die Expression zu verändern. Im Gegensatz zu den von uns durchgeführten Microarray Analysen, ist auch keine Aussage über die Richtung der Regulation möglich. Dafür sind alle erfassten Kandidaten direkte Zielgene von HNF4 α , während es sich bei den von uns gefundenen Zielgenen auch um sekundäre Zielgene handeln kann, die z.B. über das Transkriptionsfaktor-Netzwerk reguliert werden.

Mit Hilfe eines anderen Tetracyclin-induzierbaren Systems zur Transgenexpression wurden Glut-2, L-Pyruvat-Kinase, 2-Oxoglutarat Dehydrogenase E1 Untereinheit, Aldolase B und HNF1 α als Zielgene von HNF4 α in INS-1 Zellen ermittelt (Wang et al., 2000). Alle diese Gene sind auf dem verwendeten Microarray repräsentiert und aktiv, doch

nur Aldolase B wird als Zielgen von HNF4 α angezeigt, bei Induktion mit 1 μ g/ml Tetracyclin kommt noch Glut-2 hinzu. Die von Wang et al. mittels Northern Blot gezeigte Aktivierung von HNF1 α ist recht gering und daher wahrscheinlich mit unseren Auswahlkriterien nicht zu detektieren. Unterschiede können außerdem darauf zurückzuführen sein, dass Wang et al. andere INS-1 Zellen verwendet und bei der stabilen Transfektion Klone mit unterschiedlichen Eigenschaften selektioniert haben. Außerdem wurde ein anderes Expressionssystem zur Expression einer anderen Isoform (HNF4 α 1) von einer anderen Spezies (Ratte statt Mensch), verwendet.

Die Ergebnisse der Microarray Analysen werden von verschiedenen Faktoren wie der Array-Beschaffenheit und -Produktion, der RNA-Isolation, der Probenmarkierung, den Hybridisierungsbedingungen und der Bildanalyse beeinflusst (Rajeevan et al., 2001). Bei unseren Analysen werden Schwankungen dieser Parameter minimiert, da normierte, industriell gefertigte Chips (Affymetrix GeneChips) verwendet und bis auf die RNA-Isolation alle Schritte von identischen Personen in einer zentralen Einheit durchgeführt wurden. Trotzdem variieren die Ergebnisse von Microarray Analysen stark, wenn man z.B. identische Proben mit verschiedenen Plattformen analysiert und ausgewählte Zielgene sollten daher mit einer unabhängigen Methode überprüft werden (Tan et al., 2003). Dazu wurde hier die real time RT-PCR gewählt, für die etwa 1000fach weniger RNA benötigt wird, als für alternative Assays wie den Northern Blot oder den RNase Protection Assay (Rajeevan et al., 2001). Durch die Verwendung von etablierten TaqMan Sonden wurde dabei die Spezifität der Reaktion nochmals erhöht und ermöglicht die Detektion von einer mRNA Kopie in 10 bis 100 Zellen (Yin et al., 2001). Gegenüber der Microarray Analyse hat die real time RT-PCR auch den Vorteil, dass sie einen größeren dynamischen Bereich hat, der durch verschiedene Konzentrationen der einzelnen Proben optimaler erreicht werden kann. Außerdem gibt es nur einen geringen bis gar keinen Qualitätsverlust bei geringen Konzentrationen der zu detektierenden Sequenzen (Kane et al., 2000). Sieben ausgewählte Zielgen-Kandidaten wurden mit der real time RT-PCR überprüft, wobei die grundsätzliche Regulation von sechs der sieben Kandidaten bestätigt werden konnte (Abb. 22). Das spricht für die gute Qualität der von uns gewonnenen Microarray Daten und der verwendeten Filterkriterien. Die genauen Werte der Induktion sind allerdings sehr verschieden, ein Umstand, der auch bei anderen Studien beobachtet wurde (Rajeevan et al., 2001; Yuen et al., 2002). Dies kann auf die Empfindlichkeit der Methoden und auch auf die verschiedenen zur Auswertung verwendeten Algorithmen zurückzuführen sein. So führt bereits die Auswertung identischer GeneChip Daten mit verschiedenen Algorithmen

zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Tan et al., 2003). Außerdem können verschiedenen Zielsequenzen, also die kurzen Basenfolgen aus der Gensequenz, die tatsächlich detektiert werden, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, da sie verschiedene Genfamilien oder Spleißformen erfassen oder Kreuz-Reaktivitäten aufweisen können.

Abschließend läßt sich sagen, dass die generelle Regulation in den durchgeführten Microarrays als sehr zuverlässig betrachtet werden kann, die fachen Induktionen jedoch keine genauen Werte darstellen.

4.2 HNF4 α 2 und HNF4 α 8 regulieren die gleiche Gruppe von Genen

Die Induktion der Expression von HNF4 α 8 ergab mit 100 Zielgenen eine mehr als zweifach geringere Menge als die von HNF4 α 2 (Abb. 19). Dieses Ergebniss stimmt gut mit den für diese Isoform beobachteten schwächeren Effekten in den funktionellen Assays und mit anderen Berichten über ein geringeres Transaktivierungspotential der P2 Isoformen (Eeckhoutte et al., 2003) überein, und ist wahrscheinlich auf das Fehlen der Aktivierungsfunktion AF1 zurückzuführen (Torres-Padilla et al., 2002). Für die P1 und P2 Isoformen von HNF4 α wurde in der Leber von Mäusen eine entwicklungsabhängige Regulation gezeigt, wobei ihr Transaktivierungspotential mit ihrem Expressionsmuster übereinzustimmen scheint (Torres-Padilla et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keinen solchen generellen Mechanismus in β -Zellen. Obwohl in der Microarray Analyse etwa ein Drittel der von HNF4 α 8 regulierten Gene nicht von HNF4 α 2 reguliert werden (Abb. 19), deuten die durchgeführten real time RT PCR Analysen, die präziser und verlässlicher als die Microarray Versuche sind, darauf hin, dass dieser Anteil tatsächlich niedriger ist (Abb. 22). Für beide in der real time untersuchten Kandidaten, die laut Microarray Analyse ausschließlich von HNF4 α 8 reguliert werden (Transthyretin und Amino(m)peptidase), konnte diese exklusive Regulation nicht bestätigt werden (Abb.22). Unsere Daten weisen darauf hin, dass HNF4 α 2 und HNF4 α 8 in β -Zellen in großen Teilen die gleiche Gruppe von Genen regulieren, wobei HNF4 α 8 ein schwächerer Transaktivator ist. So zeigt die Zuordnung der Zielgene entsprechend ihren Gene Ontology Annotationen für beide HNF4 α Isoformen eine statistisch signifikante Überrepresentation von Genen, die am Metabolismus beteiligt sind (s. Tabelle I), während die ebenfalls analysierten Transkriptionsfaktoren HNF1 β und HNF6 überproportional viele Gene die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind regulieren (s. Tabelle II).

4.3 Die Induktion von HNF4 α 2 mit 1 μ g/ μ l Tetracyclin führt zur Aktivierung zusätzlicher Zielgene

Eine zweite Analyse von HNF4 α 2 nach Induktion mit 1 μ g/ml Tetracyclin, statt wie zuvor mit 50 ng/ml, ergab nach den gleichen Filterkriterien 658 Zielgene, wobei vor allem die Anzahl der herunterregulierten Kandidaten anstieg (Abb. 21). Die starke Zunahme der Anzahl der Zielgene bei Induktion mit der höheren Tetracyclinkonzentration ist erstaunlich, da Western Blot Analysen keine bzw. nur eine geringe Erhöhung der HNF4 α Proteinmenge bei Behandlung der Zellen mit mehr als 50 ng/ml Tetracyclin zeigen (Abb. 10B). Da die anti-proliferativen und apoptotischen Effekte von HNF4 α jedoch nach Induktion mit 50 ng/ml Tetracyclin festgestellt wurden, sollte die entsprechende Microarray Analyse die relevanten Zielgene enthalten.

4.4 In den nicht-induzierten INS-1 T-REx Flp-In HNF4 α Zelllinien ist eine geringe Zahl von Genen bereits reguliert

Im Western Blot zeigt sich, dass geringe Mengen des Transgens bereits im nicht induzierten Zustand exprimiert werden (Abb. 10A/B). Um die Folgen dieser Durchlässigkeit des Expressionssystem auf die Regulation von Zielgenen zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile der beiden nicht-induzierten Flp-In HNF4 α 2 bzw. Flp-In HNF4 α 8 Zelllinien jeweils mit denen der nicht-induzierten Flp-In R154X Zelllinien verglichen. Dabei wurden diejenigen Transkripte als reguliert betrachtet, die in allen vier Vergleichs-Kombinationen von den zwei Zelllinien der jeweiligen HNF4 α -Isoform zu den beiden R154X Zelllinien, mindestens eine zweifach veränderte Transkriptmenge aufwiesen. Dabei ergaben sich für HNF4 α 2 65 und für HNF4 α 8 40 Gene (Tabelle AVII). Dies könnten zunächst auch zufällige Unterschiede der Zellpopulationen sein, da aber jeweils beide Zelllinien eines Transgens diese Unterschiede zeigten, ist es wahrscheinlich, dass es sich um Gene handelt, die durch das basale Transgenprodukt reguliert werden. Nur 14 (HNF4 α 2) bzw. 6 (HNF4 α 8) von diesen Genen werden bei Induktion mit 50 ng/ml Tetracyclin im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen reguliert (Tabelle VII, mit*), davon zwei (HNF4 α 2) bzw. eins (HNF4 α 8) in gegensätzliche Richtung. In den von uns ermittelten Zielgenen von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 fehlen möglicherweise einige dieser Gene, da sie bereits in den nicht-induzierten Referenzzellen reguliert sind. Dieses können aber nicht die von uns gesuchten Gene sein, die für eine Vermittlung der anti-proliferativen und apoptotischen Effekte von HNF4 α in Frage kommen, da diese Effekte bei den

induzierten Zellen im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen deutlich nachgewiesen wurden.

5 Kandidaten für die Vermittlung der HNF4 α -abhängigen Effekte auf das Zellwachstum

Unter den Zielgenen von HNF4 α konnten durch die Gene Ontology Bezeichnungen und die Überprüfung der Kandidaten mit Hilfe von Datenbanken wie OMIM und PubMed nur wenige Gene mit einer direkten Verbindung zu Zellproliferation und Apoptose ermittelt werden. Für zwei von ihnen, AIF und KAI1, konnte eine Hochregulation durch HNF4 α 2 mittels real time RT-PCR bestätigt werden.

5.1 Der Apoptose-induzierende Faktor AIF

Der Apoptose-induzierende Faktor AIF wurde zuerst 1999 kloniert und beschrieben (Susin et al., 1999). AIF ist ein ubiquitärer Zelltod-Effektor, der im Membran-Zwischenraum der Mitochondrien lokalisiert ist und auf proapoptotische Signale hin ins Cytoplasma und anschließend in den Zellkern wandert (Susin et al., 1999). Er interagiert direkt mit dem Chromatin und führt zu dessen Kondensation, zu DNA-Degradation in ~50kb Fragmente und zu DNA Verlust (Susin et al., 1999; Ye et al., 2002). Durch Entfernen der mitochondrialen Lokalisations-Sequenz (MLS) oder durch Mikroinjektionen ektopisch, d.h. extramitochondrial lokalisiertes AIF führt zu Caspase-unabhängiger Apoptose in verschiedenen Zelllinien (Susin et al., 1999; Loeffler et al., 2001). Auch die Überexpression von AIF-Konstrukten in stabilen Zelllinien kann zu spontaner Translokation in den Kern und damit zu Apoptose führen (Loeffler et al., 2001). Bei Expression von HNF4 α 2 in den Flp-In INS-1 Zellen ergab sich in den Microarray Analysen für AIF im Mittel eine Induktion von 2,4 bzw. 3,5 nach Behandlung der Zellen mit 50 ng/ml bzw. 1 μ g/ml Tetracyclin (Tabelle III). Die real time RT-PCR Analyse (50 ng/ml Tetracyclin) zeigt eine Induktion von 4,2 (Abb. 22). Die Expression von HNF4 α 8 führt nicht zu einer signifikanten Induktion von AIF (Abb. 22). Da die Expression von HNF4 α 2 auch zu einer deutlich heftigeren Apoptose führt als die von HNF4 α 8, ist AIF ein guter Kandidat für deren Vermittlung. In der Immunfluoreszenz kann die mitochondriale Lokalisation deutlich beobachtet werden, eine vermehrte Akkumulation im Kern nach HNF4 α Expression gab es jedoch nicht (Abb. 23A). Im Western Blot konnte nur bei einer Zelllinie eine geringe Zunahme der AIF-Proteinmenge nach Induktion der HNF4 α Expression detektiert werden (Abb. 23B). Möglicherweise liegt die Zunahme an der Detektionsgrenze dieser Methode und bereits eine nur wenig geringere Induktion bei der

zweiten Zelllinie läßt einen Nachweis nicht mehr zu. Um eine mögliche Rolle von AIF bei der HNF4 α -abhängigen Apoptose genauer zu untersuchen, wurde es konditionell in INS-1 Zellen exprimiert.

Zwei stabile INS-1 T-REx Flp-In Zelllinien zur Expression von AIF wurden etabliert (Abb. 24) und Immunfluoreszenz und Western Blot zeigen die erfolgreiche Induktion der Transgenexpression (Abb. 25B/C). Das Signal im Western Blot erscheint vor allem bei der Zelllinie AIF#1 sehr schwach, auch im Vergleich zur Bande des endogenen Proteins (Abb. 25B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das transgene AIF am C-Terminus, der von dem verwendeten Antikörper erkannt wird, mit EGFP fusioniert ist. Dass das Transgen tatsächlich exprimiert wird, erkennt man in der Immunfluoreszenz, in der selbst AIF#1 nach Induktion eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz-Intensität in über 90 % der Zellen zeigt (Abb. 25C). Das Protein ist wie erwartet in den Mitochondrien konzentriert. Allerdings läßt sich, wie nach Induktion der HNF4 α 2 Expression, im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen keine vermehrte Lokalisation von AIF im Zellkern feststellen. Die beobachtete morphologische Veränderung der INS-1 Zellen nach AIF Expression ist gering und nicht mit der Wirkung von HNF4 α vergleichbar (Abb. 25C). Tote Zellen sind nicht vermehrt sichtbar. Der Anteil der vitalen Zellen nimmt nach AIF Expression im Vergleich zu den entsprechenden nicht-induzierten Zellen langsam ab, wobei eine stärkere Reduktion des Zellwachstums bei der Zelllinie AIF#2 zu beobachten ist (Abb. 27), in Übereinstimmung mit der im Western Blot detektierten AIF-Proteinmenge nach Induktion (Abb. 25B). Die Stärke der Hemmung ist jedoch wesentlich geringer als der Effekt von HNF4 α (Abb. 27). Eine Aktivierung der Caspasen 3/7 ist nicht detektierbar (Abb. 28). Allerdings ist die Rolle von Caspasen in der AIF-vermittelten Apoptose umstritten und eine Caspase-unabhängige Wirkung von AIF im Zellkern wurde nachgewiesen (zusammengefasst in Cregan et al., 2004). Aufgrund der geringeren Wachstumshemmung und der fehlenden Zunahme toter Zellen erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass AIF alleine die anti-proliferativen und apoptotischen Effekte von HNF4 α vermittelt. Die Hochregulation von AIF könnte tatsächlich auch mit seiner zweiten, unabhängigen physiologischen Funktion als NADH-Oxidase zusammenhängen (Klein et al., 2002). In dieser Funktion wirkt AIF anti-apoptotisch als Antioxidant bzw. Radikalfänger. Neue Studien weisen außerdem darauf hin, dass die Oxidoreduktase-Funktion von AIF für die Aufrechterhaltung der Glutathionkonzentration in der Zelle bei Streß benötigt wird (Cande et al., 2004). Möglicherweise stellt die Hochregulation von AIF also eine Antwort auf metabolischen Streß nach Expression von HNF4 α oder auf einen z.B. durch KAI1

ausgelösten Anstieg von reaktiven Sauerstoffmolekülen oder Verlust von Glutathion dar. Die durch die Flp-In Zellen erreichte Expression von AIF ist eventuell nicht stark genug, um eine spontane Translokation des Proteins in den Kern und somit eine apoptotische Wirkung auszulösen. Einen Hinweis darauf gibt möglicherweise das schwache Western Blot Signal bei Induktion der Flp-In AIF Zelllinien (Abb. 25 B), das allerdings auch auf das bei dem Transgen C-terminal fusionierte EGFP zurückzuführen sein könnte, da der verwendete Antikörper am C-Terminus bindet.

5.2 Der Metastasen-Suppressor KAI1

KAI1 (C33/CD82) ist ein Glykoprotein der 4-Transmembran Familie das ursprünglich als Metastasen-Suppressor-Gen in Prostata Krebs identifiziert wurde (Dong et al., 1995). Es wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und wurde inzwischen bei der malignen Progression einer großen Anzahl von Krebsformen herunterreguliert gefunden. Es inhibiert den invasiven Charakter von verschiedensten Tumorzellen (zusammengfaßt in Wu et al., 2004) und ist ein Marker für eine schlechte Prognose bei Lungen-, Brust- und Pankreaskrebs (zusammengefasst in Bienstock and Barrett, 2001). KAI1 ist ein direktes Zielgen des Tumorsuppressors p53 (Mashimo et al., 1998) und funktionelle Assays weisen darauf hin, dass ein Funktionsverlust von p53 und/oder eine verringerte Expression von junB, in Kombination mit einer reduzierten Expression bestimmter AP2 Proteine, für die verringerte Expression in Tumorzellen verantwortlich ist (Marreiros et al., 2005).

In einer aktuellen Studie wurde KAI1 in einem Screen nach Apoptose-Induktoren identifiziert (Albayrak and Grimm, 2003) und in Folge konnte gezeigt werden, dass es in einer Reihe von Zelllinien Apoptose induziert (Schoenfeld et al., 2004). Die Induktion der Apoptose erfolgt dabei durch die Erzeugung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROIs) und wird durch die Aktivierung der kleinen GTPase Cdc42 und der von dieser verursachten Freisetzung des intrazellulären Antioxidants Glutathion aus den Zellen, vermittelt (Schoenfeld et al., 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass KAI1 in INS-1 Zellen von beiden HNF4 α Spleißformen stabil hochreguliert wird. Die Microarray Analyse ergibt eine 3,8-fache bzw. 4,7-fache Erhöhung der KAI1 Expression nach HNF4 α 2 Induktion mit 50 ng/ml bzw. 1 μ g/ml Tetracyclin und die Induktion von HNF4 α 8 (50 ng/ml Tetracyclin) führt zu einer etwas geringeren 2,6-fachen Steigerung (Tabelle III). Die real time RT-PCR Daten stimmen mit einer Expressionsteigerung von 3,7 (HNF4 α 2) und 2,4 (HNF4 α 8) sehr gut mit diesen Werten überein (Abb. 22). Um zu untersuchen, ob KAI1

die antiproliferativen und apoptotischen Effekte von HNF4 α vermittelt, wurde es konditionell in INS-1 Zellen exprimiert.

Zur konditionellen Expression von humanem KAI1 wurden zwei unabhängige INS-1 T-REx Flp-In Zelllinien etabliert (Abb. 24) und die Induktion des Transgens mit Hilfe eines real time Expressionsassays, der spezifisch die humane Form erkennt, nachgewiesen. Dabei ergibt sich nach 24 Stunden eine 5 bis 6-fache Steigerung der Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen (Abb. 25A). Die Darstellung der gemessenen relativen Transkriptmenge in Abbildung 25A zeigt, dass wie zuvor für andere INS-1 Flp-In Zelllinien beobachtet, die Zellen auch nicht-induziert bereits geringe Mengen des Transgens exprimieren. Die nicht-induzierten Zellen verhalten sich jedoch unauffällig, während sich die induzierten Zellen nach 24 Stunden verkleinern, abrunden und in kleinen, vereinzelt Haufen, auch dreidimensional, wachsen (Abb. 26). Das Abrunden ist ein typisches Charakteristikum von Zellen, die in die Apoptose eintreten, aber auch nach zwei oder drei Tagen ist kein vermehrtes Auftreten toter Zellen zu beobachten. Die morphologischen Veränderungen könnten auch mit den für KAI1 vermuteten Funktionen in Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen (Dong et al., 1995) im Zusammenhang stehen. KAI1 assoziiert unter anderem mit Integrinen und Cadherinen und zahlreichen anderen Oberflächenrezeptoren (zusammengefasst in Bienstock and Barrett, 2001) und kann starke zelluläre Adhesion im Zusammenhang mit Aktin-Polymerisation hervorrufen (Lagaudriere-Gesbert et al., 1998). Der nach Induktion der KAI1 Expression im MTS gemessene Anteil vitaler Zellen nimmt zwar nach einem Tag etwas ab, der nach zwei Tagen erreichte Wert stabilisiert sich jedoch und verringert sich nicht weiter (Abb. 27). Weder die morphologischen Veränderungen noch der Einfluß auf das Zellwachstum sind mit den Effekten von HNF4 α vergleichbar. Auch eine Aktivierung der Caspase-Aktivität bei KAI1 Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die induzierte Expression des humanen KAI1 nicht hoch genug, um Apoptose auszulösen. Allerdings zeigen die morphologischen Veränderungen die prinzipielle Wirksamkeit der Transgenexpression in über 90 % der Zellen. Eine Bewertung der Proteinmenge im Western Blot war nicht möglich, da die verwendeten Antikörper kein eindeutig KAI1 zuzuordnendes Bandenmuster ergaben (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die multiplen N-Glykosilierungen des Proteins zurückzuführen sein (White et al., 1998). Ein weiterer Grund für die nicht vorhandene apoptotische Wirkung von KAI1 könnte die Verwendung der humanen cDNA sein. Obwohl die Aminosäuresequenzen von KAI1 der Maus und des Menschen zu 76 % identisch sind (Nagira et al., 1994), könnten die Proteine qualitativ und

quantitativ verschiedene Funktionen zeigen, etwa durch Veränderungen von posttranslationalen Modifikationen. So ist z.B. die Palmitoylierung von KAI1 für einige seiner Funktionen essentiell (Zhou et al., 2004).

Es erscheint jedoch auch aufgrund der unterschiedlichen morphologischen Veränderungen unwahrscheinlich, dass KAI1 die wachstumshemmenden oder apoptotischen Effekte von HNF4 α vermittelt.

5.3 Andere Kandidaten

Den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zufolge vermitteln weder AIF noch KAI1 die wachstumshemmenden oder apoptotischen Effekte von HNF4 α in INS-1 Zellen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sie gemeinsam mit anderen regulierten Proteinen zu den Effekten beitragen. Die Untersuchung der Folgen einer Verminderung der endogenen Expression der beiden Proteine durch siRNA konnte noch nicht erfolgreich durchgeführt werden und könnte weiteren Aufschluß über die Rolle von AIF und KAI1 in den von HNF4 α ausgeübten Funktionen erbringen.

Dass in dieser Arbeit kein Zielgen von HNF4 α identifiziert werden konnte, das vollständig die anti-proliferativen und apoptotischen Funktionen von HNF4 α vermittelt, kann verschiedene Gründe haben. Zum einen wurde nur einer von zwei existierenden Microarrays verwendet, da der zweite Chip hauptsächlich unbekannte ESTs enthält. Von den etwa 15000 Transkripten des verwendeten Chips sind nur etwa die Hälfte annotiert und von denen ist nur von einem Teil die Funktion bekannt oder beschrieben. Bei dem gesuchten Gen könnte es sich auch um ein sehr niedrig reguliertes handeln, dass durch den Filterprozess nicht erfasst wurde. Auch die mögliche Rolle von microRNAs, die bei der Induktion von Apoptose beteiligt sein können, darf nicht außer Acht gelassen werden (Brennecke et al., 2003). Für die Vermittlung der HNF4 α Effekte könnte auch die Regulation mehrerer Gene und ein Zusammenspiel ihrer Produkte notwendig sein. Dabei könnten auch andere Gene als typische Apoptose-Induktoren oder Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. So könnten z.B. eines oder mehrere der zahlreichen am Metabolismus beteiligten Gene involviert sein. Die Ergebnisse der Microarray Analysen und auch das Auftreten der Lipid-Akkumulationen deuten auf einen massiven Einfluß von HNF4 α auf den Metabolismus der Zelle hin. Störungen des Metabolismus können zu Wachstumshemmung führen und z.B. über die Erzeugung von mitochondrialen Disfunktionen oder ER-Stress oder durch erhöhte Zucker- oder Lipidkonzentrationen Apoptose in β -Zellen auslösen (Oyadomari et al., 2002; Poitout and Robertson, 2002;

Maestre et al., 2003). Dies wird meist durch die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROIs) vermittelt, für die β -Zellen besonders empfindlich sind (Bast et al., 2002). Enzyme, die bei der Neutralisierung von Oxidantien eine Rolle spielen, wie z.B. Catalase und Glutathion-Synthetase, wurden in den Microarray Analysen nach HNF4 α Expression hochreguliert gefunden. Dabei könnte es sich um einen Sekundäreffekt der erhöhten ROI-Konzentration handeln. Allerdings wird auch die Wirkung vieler typischer Apoptose-Induktoren wie KAI1 durch die Bildung der reaktiven Sauerstoffmoleküle vermittelt.

6 Die Funktion von HNF4 α in MODY – ein Modell

Diese Arbeit zeigt, dass HNF4 α 2, und in geringerem Ausmaß auch die Isoform HNF4 α 8, die Proliferation von INS-1 Zellen negativ regulieren und Apoptose induzieren kann. Für den funktionell besonders in den β -Zellen mit HNF4 α verknüpften Transkriptionsfaktor HNF1 α ist bereits eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und als Tumorsuppressor-Gen in Leberadenomen bekannt (Bluteau et al., 2002; Reznik et al., 2004). Verschiedene Studien sprechen ebenfalls für eine Rolle von HNF4 α bei der Regulation von Zellproliferation und Apoptose in verschiedenen Zelltypen. So wurde eine HNF4 α -abhängige Hemmung des Zellwachstums in HEK293 Zellen gezeigt (Lausen, 2001; Lucas et al., 2005). In Nieren-Karzinomen wurde eine Verminderung der HNF4 α Expression und DNA-Bindungsfähigkeit gefunden (Sel et al., 1996) und vor kurzer Zeit wurde eine reduzierte HNF4 α Expression bei der Progression eines Leberzellkarzinoms zu einer schnell-wachsenden, hoch-invasiven, dedifferenzierten Tumor-Form festgestellt, während die Re-Expression des Transkriptionsfaktors diese Entwicklung rückgängig machen konnte (Lazarevich et al., 2004). Eine weitere aktuelle Studie zeigt, dass die Überexpression von HNF4 α in F9 Zellen und in Lungen-Epithelzellen der Ratte das Zellwachstum hemmt und die Proliferation inhibiert (Chiba et al., 2005). Die Autoren spekulieren, dass die gefundene Aktivierung des p21 Genes, dessen Produkt den CDK2 vermittelten Übergang von der G1 zur S Phase inhibiert, für das reduzierte Zellwachstum verantwortlich ist. Die Aktivierung des p21 Genes läßt sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Es ist auf den Microarrays repräsentiert, das Transkript wird aber in allen analysierten Zellen als nicht vorhanden eingestuft. Die von Chiba et al. beobachtete Hemmung des Zellwachstums ist weniger stark als die durch HNF4 α 2 in INS-1 Zellen hervorgerufene und apoptotische Zellen konnten in der Chiba Studie nicht beobachtet werden. Demnach scheint sich eine Rolle für HNF4 α bei der Regulation der

Zellproliferation abzuzeichnen, der Mechanismus bleibt aber weiter unklar. Die Induktion von Apoptose wurde hingegen bisher nur bei INS-1 Zellen beobachtet.

Die β -Zellen des Pankreas sind einer ständigen Erneuerung unterworfen und die Aufrechterhaltung bzw. die Anpassung ihrer Zahl an die metabolischen Verhältnisse wird durch Proliferation und Apoptose reguliert. Abweichungen und Störungen in einem dieser Vorgänge können zu Diabetes führen und doch sind sie noch weitgehend unerforscht. Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass HNF4 α an der Regulation von Proliferation und Apoptose in β -Zellen beteiligt sein könnte und davon ausgehend spekulieren wir, dass diese Funktion von HNF4 α eine wichtige Rolle bei der Entstehung von MODY spielt. Ein mögliches Modell geht wie in Abb. 31 dargestellt davon aus, dass die β -Zellen mit einer heterozygoten HNF4 α Mutation ihre Funktion im Glukosemetabolismus und der Insulinsekretion noch ausreichend erfüllen können. Nach einiger Zeit wird jedoch in einer β -Zelle auch die Expression des zweiten HNF4 α Allels beeinträchtigt oder ausgeschaltet, analog zu dem 2-Treffer Modell der Tumorentstehung (Knudson, Jr., 1971; Frank, 2005). Dies könnte durch eine somatische Mutation oder ein epigenetisches Ereignis, wie einen selbst-aktivierenden Kreislauf wie von Ferrer et al. vorgeschlagen, geschehen. Eine solche Zelle wäre nicht mehr oder nur noch zu sehr geringer Insulinsekretion fähig und würde mit der Zeit die heterozygoten, noch funktionellen Zellen überwachsen, da sie durch die Inaktivierung von HNF4 α einen Wachstumsvorteil hätte (Abb. 31). Die β -Zellen könnten so bald nicht mehr ausreichend Insulin sekretieren, um die Blutglukosekonzentration des Körpers in ihren physiologischen Grenzen zu halten und es käme schließlich zum Ausbruch von MODY.

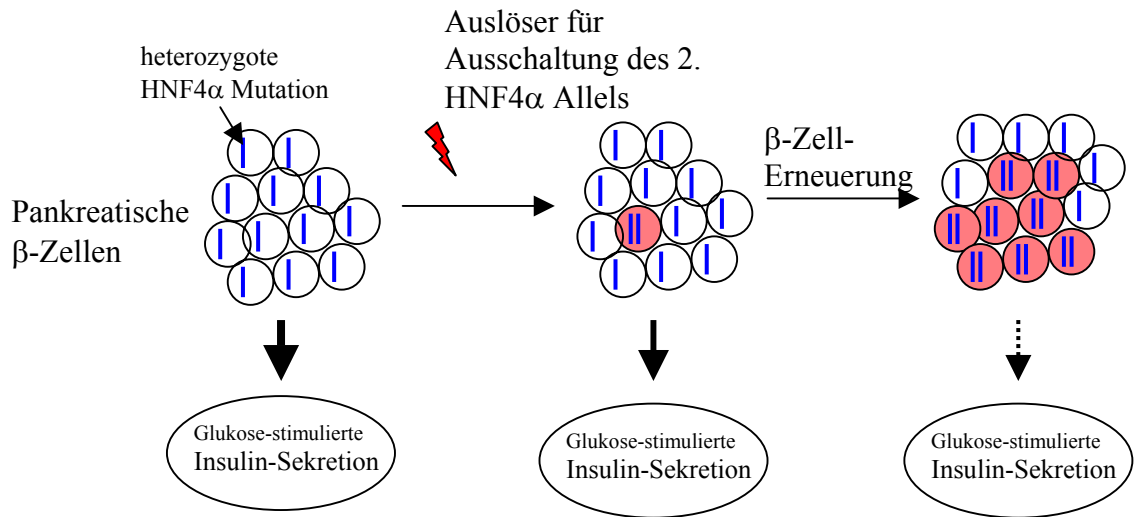


Abbildung 31: Zwei-Schritt Modell des molekularen Mechanismus der Ausbildung des MODY-Phänotyps bei einem beschwerdefrei geborenen Menschen. Die pankreatischen β -Zellen mit der heterozygoten, MODY-assoziierten Mutation des HNF4 α Genes können ihre wichtigen Funktionen, wie die Glukose-induzierte Insulin-Sekretion zunächst aufrecht erhalten. Dann kommt es zu einem Ereignis, dass in einer Zelle auch das zweite HNF4 α Allel ausschaltet, z.B. einer somatische Mutation. Diese Zelle ist nicht mehr zu ausreichender Glukose-stimulierter Insulin-Sekretion fähig. Da sie durch die Inaktivierung von HNF4 α einen Wachstumsvorteil besitzt, überwächst sie mit der Zeit die Zellen mit einem funktionellen Allel und der Körper kann immer weniger auf Glukose-Schwankungen reagieren.

V ZUSAMMENFASSUNG

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Glukose-Transport und -Metabolismus in β -Zellen. Heterozygote Mutationen des menschlichen HNF4 α Genes verursachen MODY, (Maturity Onset Diabetes of the Young) eine autosomal dominant vererbte Form von Diabetes mellitus, die durch eine fehlerhafte Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion und einen frühen Ausbruch im jungen Erwachsenenalter charakterisiert ist. Der Mechanismus, mit dem HNF4 α zu der Erkrankung führt, ist noch unbekannt und seine bisher bekannten Funktionen bieten keine Erklärung für den verzögerten Ausbruch und den progressiven Verlauf von MODY. Die vorliegende Arbeit zeigt mit zwei unabhängigen Expressionssystemen eine durch HNF4 α ausgelöste Hemmung des Wachstums von Insulinoma Zellen der Ratte (INS-1). Neben den bereits besser untersuchten Isoformen HNF4 α 1/HNF4 α 2 wurde auch die von dem alternativen Promotor P2 transkribierte Spleißform HNF4 α 8 analysiert, die in β -Zellen stark exprimiert wird. Um die beiden HNF4 α Isoformen sowie als Kontrollen die natürlich vorkommende, MODY-assoziierte Mutante R154X und die künstliche Mutante C106R und GFP in stabiler, induzierbarer Form in die INS-1 Zellen einzubringen, wurde das neuartige T-REx Flp-In Expressionssystem verwendet. Es erlaubt die schnelle Etablierung verschiedener stabiler Zelllinien basierend auf einem Ausgangszellklon und führt zu einer weit größeren Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien als konventionelle Methoden. Mit diesen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Expression von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 zu einer Verringerung der Proliferationsrate und zur Induktion von Apoptose in INS-1 Zellen führt, wobei HNF4 α 8 ein schwächerer Effektor ist. Die Apoptose wurde für HNF4 α 2 mit drei unabhängigen Methoden nachgewiesen und ist durch internukleosomale DNA-Spaltung und die Aktivierung von Caspasen charakterisiert. Für HNF4 α 8 konnte nur eine schwache Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden. Die Expression beider Formen führt zu deutlichen aber verschiedenen morphologischen Veränderungen der Zellen. Die Spezifität dieser Effekte wird durch ihr Fehlen bei Expression der Mutanten C106R und R154X gezeigt, wobei letztere auch die Bedeutung der anti-proliferativen und apoptotischen Funktionen von HNF4 α für MODY verdeutlicht. Eine Analyse der Zielgene von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 mittels Oligonukleotid Microarray zeigt, dass beide Isoformen dieselbe Gruppe von Genen regulieren. Eine systematisch bevorzugte Aktivierung bestimmter Gene, wie für Hepatocyten vorgeschlagen, konnte nicht beobachtet werden. Beide Spleißformen zeigen eine statistisch signifikante Überrepresentation von Zielgenen

aus dem Bereich des Metabolismus, im Unterschied zu den Faktoren HNF6 und HNF1 β , die vorwiegend Gene regulieren, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind. In Übereinstimmung mit seiner schwächeren Wirkung in den funktionellen Assays, reguliert HNF4 α 8 eine geringere Anzahl von Genen, was auch zu der Tatsache passt, dass den P2-Isoformen durch ihren abweichenden N-Terminus die Aktivierungsfunktion AF1 fehlt, die zur Rekrutierung von Kofaktoren beiträgt. Die erfolgreiche Bestätigung ausgewählter Zielgene durch real time PCR ist ein Hinweis auf eine hohe Zuverlässigkeit der Microarray Daten unter den gewählten Filterbedingungen. Die Funktion von zwei potentiellen Zielgenen, AIF und KAI1, von denen bekannt ist, dass sie Apoptose auslösen können, wurde durch die Etablierung stabiler INS-1 Zelllinien genauer untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass weder AIF noch KAI1 die antiproliferativen oder apoptotischen Effekte von HNF4 α in INS-1 Zellen vermitteln.

Aufgrund der vorliegenden Daten spekulieren wir, dass die Funktion von HNF4 α als Regulator von Proliferation und Apoptose der β -Zellen ein wichtiges Element bei der Entstehung von MODY ist. Denkbar wäre ein Modell, bei dem ein Ereignis in einer β -Zelle eines MODY-Patienten auch das zweite HNF4 α Allel beeinträchtigt und dieser damit einen Wachstumsvorteil gegenüber den noch funktionstüchtigeren heterozygoten Zellen verschafft. Deren abnehmender Anteil würde zu einer progressiven Verschlechterung der Insulin-Sekretion und zu MODY führen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Albayrak,T. and Grimm,S. (2003). A high-throughput screen for single gene activities: isolation of apoptosis inducers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 772-776.

Angrand,P.O., Woodroffe,C.P., Buchholz,F., and Stewart,A.F. (1998). Inducible expression based on regulated recombination: a single vector strategy for stable expression in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 3263-3269.

Asfari,M., Janjic,D., Meda,P., Li,G., Halban,P.A., and Wollheim,C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-178.

Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M., Davis,A.P., Dolinski,K., Dwight,S.S., Eppig,J.T., Harris,M.A., Hill,D.P., Issel-Tarver,L., Kasarskis,A., Lewis,S., Matese,J.C., Richardson,J.E., Ringwald,M., Rubin,G.M., and Sherlock,G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25-29.

Bartoov-Shifman,R., Hertz,R., Wang,H., Wollheim,C.B., Bar-Tana,J., and Walker,M.D. (2002). Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 25914-25919.

Bast,A., Wolf,G., Oberbaumer,I., and Walther,R. (2002). Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 45, 867-876.

Benoit,G., Malewicz,M., and Perlmann,T. (2004). Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol.* 14, 369-376.

Bienstock,R.J. and Barrett,J.C. (2001). KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol. Carcinog.* 32, 139-153.

Bluteau,O., Jeannot,E., Bioulac-Sage,P., Marques,J.M., Blanc,J.F., Bui,H., Beaudoin,J.C., Franco,D., Balabaud,C., Laurent-Puig,P., and Zucman-Rossi,J. (2002). Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat. Genet.* 32, 312-315.

Boj,S.F., Parrizas,M., Maestro,M.A., and Ferrer,J. (2001). A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14481-14486.

Bonner-Weir,S. (2000). Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol. Metab* 11, 375-378.

Brennecke,J., Hipfner,D.R., Stark,A., Russell,R.B., and Cohen,S.M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.

Butler,A.E., Janson,J., Bonner-Weir,S., Ritzel,R., Rizza,R.A., and Butler,P.C. (2003a). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.

- Butler,A.E., Janson,J., Soeller,W.C., and Butler,P.C. (2003b). Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52, 2304-2314.
- Byrne,M.M., Sturis,J., Menzel,S., Yamagata,K., Fajans,S.S., Dronsfield,M.J., Bain,S.C., Hattersley,A.T., Velho,G., Froguel,P., Bell,G.I., and Polonsky,K.S. (1996). Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* 45, 1503-1510.
- Cande,C., Vahsen,N., Metivier,D., Tourriere,H., Chebli,K., Garrido,C., Tazi,J., and Kroemer,G. (2004). Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J. Cell Sci.* 117, 4461-4468.
- Chen,H., Lin,R.J., Xie,W., Wilpitz,D., and Evans,R.M. (1999). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675-686.
- Chen,W.S., Manova,K., Weinstein,D.C., Duncan,S.A., Plump,A.S., Prezioso,V.R., Bachvarova,R.F., and Darnell,J.E., Jr. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8, 2466-2477.
- Chiba,H., Gotoh,T., Kojima,T., Satohisa,S., Kikuchi,K., Osanai,M., and Sawada,N. (2003). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 286, 288-297.
- Chiba,H., Itoh,T., Satohisa,S., Sakai,N., Noguchi,H., Osanai,M., Kojima,T., and Sawada,N. (2005). Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Exp. Cell Res.* 302, 11-21.
- Cohen,S.N., Chang,A.C., and Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 69, 2110-2114.
- Costa,R.H., Grayson,D.R., and Darnell,J.E., Jr. (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol. Cell Biol.* 9, 1415-1425.
- Cregan,S.P., Dawson,V.L., and Slack,R.S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23, 2785-2796.
- Dhe-Paganon,S., Duda,K., Iwamoto,M., Chi,Y.I., and Shoelson,S.E. (2002). Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37973-37976.
- Dickson,L.M. and Rhodes,C.J. (2004). Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 287, E192-E198.

- Dong, J.T., Lamb, P.W., Rinker-Schaeffer, C.W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J.T., and Barrett, J.C. (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 268, 884-886.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., and Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G.U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Molecular and Cellular Biology* 16, 925-931.
- Duda, K., Chi, Y.I., and Shoelson, S.E. (2004). Structural basis for HNF-4 α activation by ligand and coactivator binding. *J. Biol. Chem.* 279, 23311-23316.
- Duncan, S.A., Nagy, A., and Chan, W. (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124, 279-287.
- Durig, J., Nuckel, H., Huttmann, A., Kruse, E., Holter, T., Halfmeyer, K., Fuhrer, A., Rudolph, R., Kalhori, N., Nusch, A., Deaglio, S., Malavasi, F., Moroy, T., Klein-Hitpass, L., and Duhrsen, U. (2003). Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101, 2748-2755.
- Eeckhoutte, J., Moerman, E., Bouckennooghe, T., Lukoviak, B., Pattou, F., Formstecher, P., Kerr-Conte, J., Vandewalle, B., and Laine, B. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4 α Isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology* 144, 1686-1694.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Fajans, S.S., Bell, G.I., and Polonsky, K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.* 345, 971-980.
- Ferrer, J. (2002). A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes* 51, 2355-2362.
- Flier, S.N., Kulkarni, R.N., and Kahn, C.R. (2001). Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 98, 7475-7480.
- Forman, B.M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G.J., Jr., and Evans, R.M. (1997). The orphan nuclear receptor LXR α is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 94, 10588-10593.
- Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F., and Auwerx, J. (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol* 65, 261-311.
- Frank, S.A. (2005). Age-specific incidence of inherited versus sporadic cancers: A test of the multistage theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* 102(4):1071-5

- Fraser,J.D., Keller,D., Martinez,V., Santiso-Mere,D., Straney,R., and Briggs,M.R. (1997). Utilization of recombinant adenovirus and dominant negative mutants to characterize hepatocyte nuclear factor 4-regulated apolipoprotein AI and CIII expression. *J. Biol. Chem.* 272, 13892-13898.
- Froguel,P. and Velho,G. (1999). Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. *Trends Endocrinol. Metab* 10, 142-146.
- Furuta,H., Iwasaki,N., Oda,N., Hinokio,Y., Horikawa,Y., Yamagata,K., Yano,N., Sugahiro,J., Ogata,M., Ohgawara,H., Omori,Y., Iwamoto,Y., and Bell,G.I. (1997). Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46, 1652-1657.
- Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W., and Bujard,H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Gragnoli,C., Lindner,T., Cockburn,B.N., Kaisaki,P.J., Gragnoli,F., Marozzi,G., and Bell,G.I. (1997). Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46, 1648-1651.
- Greschik,H., Wurtz,J.M., Sanglier,S., Bourguet,W., van Dorsselaer,A., Moras,D., and Renaud,J.P. (2002). Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol. Cell* 9, 303-313.
- Hadzopoulou-Cladaras,M., Kistanova,E., Evagelopoulou,C., Zeng,S., Cladaras,C., and Ladias,J.A. (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 272, 539-550.
- Hansen,S.K., Parrizas,M., Jensen,M.L., Pruhova,S., Ek,J., Boj,S.F., Johansen,A., Maestro,M.A., Rivera,F., Eiberg,H., Andel,M., Lebl,J., Pedersen,O., Ferrer,J., and Hansen,T. (2002). Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *J. Clin. Invest* 110, 827-833.
- Hata,S., Tsukamoto,T., and Osumi,T. (1992). A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim. Biophys. Acta* 1131, 211-213.
- Hattersley,A.T. (1998). Maturity-onset diabetes of the young: Clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabetic Medicine* 15, 15-24.
- Hayhurst,G.P., Lee,Y.H., Lambert,G., Ward,J.M., and Gonzalez,F.J. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1393-1403.
- Inoue,Y., Miyazaki,M., Tsuji,T., Sakaguchi,M., Fukaya,K., Huh,N.H., and Namba,M. (2001). Reactivation of liver-specific gene expression in an immortalized human hepatocyte cell line by introduction of the human HNF4 alpha 2 gene. *International Journal of Molecular Medicine* 8, 481-487.

- Kane,M.D., Jatkoa,T.A., Stumpf,C.R., Lu,J., Thomas,J.D., and Madore,S.J. (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* 28, 4552-4557.
- Kedersha,N. and Anderson,P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 963-969.
- Klein,J.A., Longo-Guess,C.M., Rossmann,M.P., Seburn,K.L., Hurd,R.E., Frankel,W.N., Bronson,R.T., and Ackerman,S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
- Kliwer,S.A., Sundseth,S.S., Jones,S.A., Brown,P.J., Wisely,G.B., Koble,C.S., Devchand,P., Wahli,W., Willson,T.M., Lenhard,J.M., and Lehmann,J.M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 94, 4318-4323.
- Kloppel,G., Lohr,M., Habich,K., Oberholzer,M., and Heitz,P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv. Synth. Pathol. Res.* 4, 110-125.
- Knudson,A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 68, 820-823.
- Koopman,R., Schaart,G., and Hesselink,M.K. (2001). Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem. Cell Biol.* 116, 63-68.
- Kritis,A.A., Argyrokastritis,A., Moschonas,N.K., Power,S., Katrakili,N., Zannis,V.I., Cereghini,S., and Talianidis,I. (1996). Isolation and characterization of a third isoform of human hepatocyte nuclear factor 4. *Gene* 173, 275-280.
- Kuo,M.H., Zhou,J., Jambeck,P., Churchill,M.E., and Allis,C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* 12, 627-639.
- Lagaudriere-Gesbert,C., Lebel-Binay,S., Hubeau,C., Fradelizi,D., and Conjeaud,H. (1998). Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 28, 4332-4344.
- Laine,B., Eeckhoutte,J., Suaud,L., Briche,I., Furuta,H., Bell,G.I., and Formstecher,P. (2000). Functional properties of the R154X HNF-4alpha protein generated by a mutation associated with maturity-onset diabetes of the young, type. *FEBS Lett.* 479, 41-45.
- Laurent,M. and Kellershohn,N. (1999). Multistability: a major means of differentiation and evolution in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 24, 418-422.
- Lausen, J. Einfluss Diabetes-assoziiierter Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF4alpha. 2001.
Ref Type: Thesis/Dissertation

- Lausen,J., Thomas,H., Lemm,I., Bulman,M., Borgschulze,M., Lingott,A., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4 alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Research* 28, 430-437.
- Lazarevich,N., Cheremnova,O.A., Varga,E.V., Ovchinnikov,D.A., Kudrjajtseva,E.I., Morozova,O.V., Fleishman,D.I., Engelhardt,N.V., and Duncan,S.A. (2004). Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* 39, 1038-1047.
- Leonardi,O., Mints,G., and Hussain,M.A. (2003). Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* 149, 99-102.
- Li,J., Ning,G., and Duncan,S.A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.* 14, 464-474.
- Lindner,T., Gragnoli,C., Furuta,H., Cockburn,B.N., Petzold,C., Rietzsch,H., Weiss,U., Schulze,J., and Bell,G.I. (1997). Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4alpha/MODY1 gene. *J. Clin. Invest* 100, 1400-1405.
- Loeffler,M., Daugas,E., Susin,S.A., Zamzami,N., Metivier,D., Nieminen,A.L., Brothers,G., Penninger,J.M., and Kroemer,G. (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J.* 15, 758-767.
- Love-Gregory,L.D., Wasson,J., Ma,J., Jin,C.H., Suarez,B.K., and Permutt,M.A. (2003). A common polymorphism in the upstream promoter (P2) of the HNF4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes (T2DM) and appears to account for the evidence for linkage in an Ashkenazi Jewish population. *American Journal of Human Genetics* 73, 534.
- Lucas,B., Grigo K., Erdmann S., Lausen J., Klein-Hitpass L., and Ryffel G.U. (2005). HNF4alpha reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene* - submitted.
- Luisi,B.F., Xu,W.X., Otwinowski,Z., Freedman,L.P., Yamamoto,K.R., and Sigler,P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.
- Maestre,I., Jordan,J., Calvo,S., Reig,J.A., Cena,V., Soria,B., Prentki,M., and Roche,E. (2003). Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 144, 335-345.
- Marreiros,A., Dudgeon,K., Dao,V., Grimm,M.O., Czolij,R., Crossley,M., and Jackson,P. (2005). KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells. *Oncogene* 24, 637-649.
- Mashimo,T., Watabe,M., Hirota,S., Hosobe,S., Miura,K., Tegtmeyer,P.J., Rinker-Shaeffer,C.W., and Watabe,K. (1998). The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 95, 11307-11311.

- Moore, G.E., Gerner, R.E., and Franklin, H.A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 199, 519-524.
- Nagira, M., Imai, T., Ishikawa, I., Uwabe, K.I., and Yoshie, O. (1994). Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure, and expression. *Cell Immunol.* 157, 144-157.
- Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., and Ryffel, G.U. (1998). An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 alpha predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Research* 26, 497-504.
- Odom, D.T., Zizlsperger, N., Gordon, D.B., Bell, G.W., Rinaldi, N.J., Murray, H.L., Volkert, T.L., Schreiber, J., Rolfe, P.A., Gifford, D.K., Fraenkel, E., Bell, G.I., and Young, R.A. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303, 1378-1381.
- Oyadomari, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 7, 335-345.
- Parviz, F., Li, J.X., Kaestner, K.H., and Duncan, S.A. (2002). Generation of a conditionally null allele of hnf4 alpha. *Genesis* 32, 130-133.
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K.H., Rossi, J.M., Zaret, K.S., and Duncan, S.A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* 34, 292-296.
- Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S., and Polonsky, K.S. (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47, 358-364.
- Poitout, V. and Robertson, R.P. (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143, 339-342.
- Polonsky, K.S. (2000). Dynamics of insulin secretion in obesity and diabetes. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 24 Suppl 2, S29-S31.
- Price, J.A., Fossey, S.C., Sale, M.M., Brewer, C.S., Freedman, B.I., Wuerth, J.P., and Bowden, D.W. (2000). Analysis of the HNF4 alpha gene in Caucasian Type II diabetic nephropathic patients. *Diabetologia* 43, 364-372.
- Rajeevan, M.S., Vernon, S.D., Taysavang, N., and Unger, E.R. (2001). Validation of array-based gene expression profiles by real time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.* 3, 26-31.
- Reznik, Y., Dao, T., Coutant, R., Chiche, L., Jeannot, E., Clauin, S., Rousselot, P., Fabre, M., Oberti, F., Fatome, A., Zucman-Rossi, J., and Bellanne-Chantelot, C. (2004). Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)3 families. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 1476-1480.
- Ruse, M.D., Jr., Privalsky, M.L., and Sladek, F.M. (2002). Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain. *Mol. Cell Biol.* 22, 1626-1638.

- Ryffel,G.U. and Lingott,A. (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1 alpha promoter in transgenic *Xenopus*. *Mechanisms of Development* 90, 65-75.
- Sablin,E.P., Krylova,I.N., Fletterick,R.J., and Ingraham,H.A. (2003). Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol. Cell* 11, 1575-1585.
- Sambrock,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1998). *Molecular cloning-a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory).
- Schoenfeld,N., Bauer,M.K., and Grimm,S. (2004). The metastasis suppressor gene C33/CD82/KAI1 induces apoptosis through reactive oxygen intermediates. *FASEB J.* 18, 158-160.
- Sel,S., Ebert,T., Ryffel,G.U., and Drewes,T. (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 alpha and HNF1 alpha. *Cancer Letters* 101, 205-210.
- Servitja,J.M. and Ferrer,J. (2004). Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* 47, 597-613.
- Shih,D.Q., Bussen,M., Sehayek,E., Ananthanarayanan,M., Shneider,B.L., Suchy,F.J., Shefer,S., Bollileni,J.S., Gonzalez,F.J., Breslow,J.L., and Stoffel,M. (2001). Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat. Genet.* 27, 375-382.
- Silander,K., Mohlke,K.L., Scott,L.J., Peck,E.C., Hollstein,P., Skol,A.D., Jackson,A.U., Deloukas,P., Hunt,S., Stavrides,G., Chines,P.S., Erdos,M.R., Narisu,N., Conneely,K.N., Li,C., Fingerlin,T.E., Dhanjal,S.K., Valle,T.T., Bergman,R.N., Tuomilehto,J., Watanabe,R.M., Boehnke,M., and Collins,F.S. (2004). Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1141-1149.
- Sladek and Seidel (2001). Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha. In *Nuclear Receptors and Genetic Disease*, pp. 309-361.
- Sladek,F.M., Ruse,M.D., Nepomuceno,L., Huang,S.M., and Stallcup,M.R. (1999). Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 alpha 1. *Molecular and Cellular Biology* 19, 6509-6522.
- Smolen,P., Baxter,D.A., and Byrne,J.H. (2000). Mathematical modeling of gene networks. *Neuron* 26, 567-580.
- Spath,G.F. and Weiss,M.C. (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Molecular and Cellular Biology* 17, 1913-1922.
- Stern,M.P. (2000). Strategies and prospects for finding insulin resistance genes. *J. Clin. Invest* 106, 323-327.

- Stoffel,M. and Duncan,S.A. (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 13209-13214.
- Susin,S.A., Lorenzo,H.K., Zamzami,N., Marzo,I., Snow,B.E., Brothers,G.M., Mangion,J., Jacotot,E., Costantini,P., Loeffler,M., Larochette,N., Goodlett,D.R., Aebersold,R., Siderovski,D.P., Penninger,J.M., and Kroemer,G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* *397*, 441-446.
- Tan,P.K., Downey,T.J., Spitznagel,E.L., Jr., Xu,P., Fu,D., Dimitrov,D.S., Lempicki,R.A., Raaka,B.M., and Cam,M.C. (2003). Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* *31*, 5676-5684.
- Taylor,D.G., Haubenwallner,S., and Leff,T. (1996). Characterization of a dominant negative mutant form of the HNF-4 orphan receptor. *Nucleic Acids Res.* *24*, 2930-2935.
- Thomas,H., Jaschkowitz,K., Bulman,M., Frayling,T.M., Mitchell,S.M., Roosen,S., Lingott-Frieg,A., Tack,C.J., Ellard,S., Ryffel,G.U., and Hattersley,A.T. (2001). A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2089-2097.
- Thomas,H., Senkel,S., Erdmann,S., Arndt,T., Turan,G., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2004). Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* *32*, e150.
- Torres-Padilla,M.E., Fougere-Deschatrette,C., and Weiss,M.C. (2001). Expression of HNF4 alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mechanisms of Development* *109*, 183-193.
- Torres-Padilla,M.E., Sladek,F.M., and Weiss,M.C. (2002). Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J. Biol. Chem.* *277*, 44677-44687.
- Torres-Padilla,M.E. and Weiss,M.C. (2003). Effects of interactions of hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms with coactivators and corepressors are promoter-specific. *Febs Letters* *539*, 19-23.
- Vaxillaire,M., Abderrahmani,A., Boutin,P., Bailleul,B., Froguel,P., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (1999). Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J. Biol. Chem.* *274*, 35639-35646.
- Vermes,I., Haanen,C., and Reutelingsperger,C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* *243*, 167-190.
- Wang,H., Iakova,P., Wilde,M., Welm,A., Goode,T., Roesler,W.J., and Timchenko,N.A. (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol. Cell* *8*, 817-828.

- Wang,H. and Iynedjian,P.B. (1997). Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* *94*, 4372-4377.
- Wang,H.Y., Maechler,P., Antinozzi,P.A., Hagenfeldt,K.A., and Wollheim,C.B. (2000). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha regulates the expression of pancreatic beta-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 35953-35959.
- Wang,J.C., Stafford,J.M., and Granner,D.K. (1998a). SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 30847-30850.
- Wang,L., Liu,L., and Berger,S.L. (1998b). Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev.* *12*, 640-653.
- Wang,Z., Benoit,G., Liu,J., Prasad,S., Aarnisalo,P., Liu,X., Xu,H., Walker,N.P., and Perlmann,T. (2003). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* *423*, 555-560.
- Werdien,D., Peiler,G., and Ryffel,G.U. (2001). FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res.* *29*, E53.
- White,A., Lamb,P.W., and Barrett,J.C. (1998). Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene* *16*, 3143-3149.
- Wobser,H., Dussmann,H., Kogel,D., Wang,H., Reimertz,C., Wollheim,C.B., Byrne,M.M., and Prehn,J.H. (2002). Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. *J. Biol. Chem.* *277*, 6413-6421.
- Wu,D.H., Liu,L., Chen,L.H., and Ding,Y.Q. (2004). KAI1 gene expression in colonic carcinoma and its clinical significances. *World J. Gastroenterol.* *10*, 2245-2249.
- Ye,H., Cande,C., Stephanou,N.C., Jiang,S., Gurbuxani,S., Larochette,N., Daugas,E., Garrido,C., Kroemer,G., and Wu,H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 680-684.
- Yin,J.L., Shackel,N.A., Zekry,A., McGuinness,P.H., Richards,C., Putten,K.V., McCaughan,G.W., Eris,J.M., and Bishop,G.A. (2001). Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.* *79*, 213-221.
- Yuen,T., Wurmbach,E., Pfeffer,R.L., Ebersole,B.J., and Sealfon,S.C. (2002). Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* *30*, e48.
- Zhou,B., Liu,L., Reddivari,M., and Zhang,X.A. (2004). The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res.* *64*, 7455-7463.

VII ANHANG - MICROARRAY DATEN

Dargestellt sind die Ergebnisse der Microarray Analysen nach Induktion der Transgenexpression mit 50 ng/ml. Das Gensymbol wurde, wenn vorhanden, angegeben. Die Induktionen sind Mittelwerte aus den Analysen von jeweils zwei unabhängigen Zelllinien und die Probensets sind die von Affymetrix zugeordneten Referenznummern des verwendeten GeneChip RAE230A. Die Tabellen AI bis AVI zeigen die Zielgene von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 sortiert entsprechend den Venn Diagrammen in Abbildung 19.

Tabelle AI: Von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 hochregulierte Probensets

| Gensymbol | HNF4 α 2 | HNF4 α 8 | Probenset | |
|-----------|-----------------|-----------------|--------------|-----------|
| | | | Induktion | Induktion |
| LOC64305 | 136.4 | 5.3 | 1387314_at | |
| Asgr1 | 128.3 | 23.4 | 1370149_at | |
| Fhl2 | 45.4 | 2.7 | 1371951_at | |
| --- | 26.4 | 4.3 | 1377048_at | |
| Cyp2d2 | 25.5 | 8.7 | 1367917_at | |
| Pzp | 15.2 | 13.3 | 1370547_at | |
| G6pc | 12.7 | 13.6 | 1370725_a_at | |
| Acy1 | 10.6 | 2.7 | 1372170_at | |
| Serpina1 | 9.7 | 5.4 | 1367647_at | |
| Erbb3 | 9.6 | 5.2 | 1377821_at | |
| Fgb | 9.6 | 5.1 | 1370511_at | |
| G6pc | 9.4 | 8.3 | 1386944_a_at | |
| Aldh1a1 | 8.6 | 8.4 | 1387022_at | |
| --- | 8.1 | 2.4 | 1385243_at | |
| Ugt2b12 | 7.9 | 3.3 | 1368397_at | |
| --- | 7.7 | 3.5 | 1390042_at | |
| --- | 7.7 | 4.7 | 1389206_at | |
| Gchfr | 7.6 | 6.1 | 1368085_at | |
| Khk | 7.1 | 2.4 | 1387375_at | |
| Rgpr | 7.1 | 2.4 | 1387209_at | |
| RT1.S3 | 6.8 | 3.4 | 1388213_a_at | |
| Risc | 6.6 | 3.2 | 1370220_at | |
| Dig1 | 6.2 | 2.5 | 1388102_at | |
| --- | 6.1 | 5.4 | 1373309_at | |
| --- | 5.6 | 2.4 | 1374948_at | |
| --- | 5.0 | 2.5 | 1372328_at | |
| --- | 4.9 | 3.1 | 1371974_at | |
| Tgfbi | 4.9 | 2.8 | 1371913_at | |
| --- | 4.9 | 2.9 | 1398370_at | |
| Pde9a | 4.9 | 11.1 | 1374452_at | |
| Apob | 4.7 | 2.9 | 1388190_at | |
| --- | 4.6 | 3.6 | 1376226_at | |
| Akr7a2 | 4.4 | 3.4 | 1367843_at | |
| RT1.S3 | 4.3 | 2.0 | 1371123_x_at | |
| Aldob | 4.1 | 4.1 | 1370299_at | |
| --- | 4.1 | 2.4 | 1389219_at | |
| --- | 3.9 | 2.2 | 1389744_at | |

| Gensymbol | HNF4α2 | HNF4α8 | Probenset |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|
| | Induktion | Induktion | |
| Kai1 | 3.8 | 2.6 | 1386976_at |
| --- | 3.8 | 2.2 | 1390454_at |
| ADRP | 3.8 | 2.8 | 1390383_at |
| Gss | 3.8 | 3.0 | 1370365_at |
| --- | 3.7 | 2.2 | 1388537_at |
| RT1.S3 | 3.7 | 2.6 | 1388212_a_at |
| Hpgd | 3.5 | 2.4 | 1376191_at |
| --- | 3.5 | 2.3 | 1372997_at |
| --- | 3.2 | 2.4 | 1377155_at |
| Guca2b | 3.1 | 4.9 | 1387253_at |
| Aldh9a1 | 3.0 | 2.3 | 1387867_at |
| Nifs | 3.0 | 2.3 | 1387859_at |
| --- | 3.0 | 2.6 | 1372681_at |
| Dri42 | 3.0 | 3.8 | 1372101_at |
| Hpgd | 3.0 | 2.3 | 1387631_at |
| --- | 3.0 | 2.7 | 1389354_at |
| Nr1h4 | 2.9 | 2.5 | 1369073_at |
| --- | 2.9 | 2.3 | 1388720_at |
| --- | 2.8 | 2.6 | 1383906_at |
| --- | 2.7 | 2.1 | 1375934_at |
| LOC94168 | 2.6 | 2.5 | 1371030_at |
| Cat | 2.6 | 2.3 | 1367995_at |
| --- | 2.6 | 2.2 | 1388710_at |
| LOC59114 | 2.5 | 2.3 | 1387793_at |
| --- | 2.5 | 2.7 | 1374222_at |
| ldh1 | 2.5 | 2.2 | 1369954_at |
| Ramp1 | 2.2 | 2.0 | 1367791_at |

Tabelle AII: Von HNF4 α 2 und HNF4 α 8 herunterregulierte Probensets

| Gensymbol | HNF4a2 | HNF4a8 | Probenset |
|------------------|---------------|---------------|------------------|
| --- | 0.30 | 0.40 | 1375861_at |
| --- | 0.45 | 0.36 | 1373035_at |

Tabelle AIII: Nur von HNF4 α 2 hochregulierte Probensets

| Gensymbol | Induktion | Probenset |
|------------------|------------------|------------------|
| Slc21a12 | 20.0 | 1389067_at |
| RT1-Aw2 | 19.6 | 1371209_at |
| Dpyd | 18.7 | 1367994_at |
| glb | 17.9 | 1367909_at |
| --- | 14.5 | 1377135_at |
| Pdi4 | 13.6 | 1387239_a_at |
| --- | 12.4 | 1371697_at |
| Crybb1 | 10.7 | 1369985_at |
| Fah | 10.6 | 1368092_at |
| Kmo | 10.2 | 1368915_at |
| --- | 9.7 | 1377223_at |
| --- | 9.3 | 1374648_at |

| Gensymbol | Induktion | Probenset |
|-----------|-----------|--------------|
| --- | 8.8 | 1373307_at |
| --- | 7.9 | 1376615_at |
| Fgfr3 | 7.4 | 1369373_at |
| Nmbr | 7.0 | 1387515_at |
| --- | 6.8 | 1376327_at |
| Ptprr | 6.6 | 1368358_a_at |
| --- | 6.1 | 1373108_at |
| Phkg1 | 5.6 | 1387445_at |
| Decr2 | 5.2 | 1370818_at |
| Slc31a1 | 5.1 | 1368045_at |
| --- | 5.0 | 1380600_at |
| --- | 4.9 | 1372672_at |
| Cd1d1 | 4.8 | 1368593_at |
| --- | 4.8 | 1375954_at |
| Slc31a1 | 4.6 | 1388534_at |
| Fbp2 | 4.6 | 1368622_at |
| RT1-Aw2 | 4.6 | 1371171_at |
| Slc31a1 | 4.5 | 1368046_at |
| --- | 4.5 | 1390399_at |
| AGT2 | 4.4 | 1368659_at |
| Selenbp2 | 4.0 | 1367673_at |
| Slc29a3 | 3.9 | 1374200_at |
| --- | 3.9 | 1374440_at |
| --- | 3.9 | 1373732_at |
| --- | 3.8 | 1376765_at |
| RT1-A3 | 3.8 | 1369110_x_at |
| --- | 3.7 | 1371659_at |
| --- | 3.7 | 1373512_at |
| Ppap2c | 3.6 | 1388913_at |
| --- | 3.6 | 1389358_at |
| --- | 3.6 | 1389085_at |
| --- | 3.5 | 1377079_a_at |
| Slc23a1 | 3.5 | 1369169_at |
| Ccs | 3.5 | 1387038_at |
| --- | 3.4 | 1388812_at |
| --- | 3.4 | 1372302_at |
| --- | 3.4 | 1373118_at |
| Pdxk | 3.4 | 1387826_at |
| --- | 3.3 | 1376808_at |
| --- | 3.3 | 1374478_at |
| Slc19a1 | 3.3 | 1369412_a_at |
| Baat | 3.2 | 1387508_at |
| Maob | 3.2 | 1368514_at |
| Cyp4f14 | 3.2 | 1368467_at |
| Acadl | 3.2 | 1367735_at |
| Ler3 | 3.2 | 1388587_at |
| --- | 3.2 | 1388539_at |
| --- | 3.2 | 1373743_at |
| --- | 3.1 | 1374518_at |
| --- | 3.1 | 1374847_at |
| Pygl | 3.1 | 1368674_at |
| --- | 3.1 | 1372297_at |
| --- | 3.1 | 1372752_at |
| --- | 3.0 | 1390131_at |

| Gensymbol | Induktion | Probenset |
|-----------|-----------|--------------|
| --- | 3.0 | 1374678_at |
| --- | 3.0 | 1374512_at |
| --- | 3.0 | 1389412_at |
| --- | 3.0 | 1399071_at |
| Tm6p1 | 3.0 | 1369909_s_at |
| Espn | 3.0 | 1368774_a_at |
| Slc25a20 | 2.9 | 1398249_at |
| --- | 2.9 | 1372895_at |
| --- | 2.8 | 1388555_at |
| --- | 2.8 | 1372177_at |
| --- | 2.8 | 1372132_at |
| --- | 2.7 | 1373337_at |
| --- | 2.7 | 1372310_at |
| Ctbs | 2.7 | 1368331_at |
| Cyb5 | 2.7 | 1386904_a_at |
| --- | 2.7 | 1373866_at |
| Pcyt2 | 2.7 | 1368100_at |
| Gstt2 | 2.7 | 1368409_at |
| --- | 2.7 | 1390149_at |
| Myo5b | 2.7 | 1368355_at |
| --- | 2.7 | 1389552_at |
| harpb64 | 2.6 | 1372087_at |
| --- | 2.6 | 1374915_at |
| --- | 2.6 | 1375209_at |
| Fbp1 | 2.6 | 1368077_at |
| Ephx1 | 2.6 | 1387669_a_at |
| --- | 2.6 | 1383912_at |
| --- | 2.6 | 1376595_at |
| Mg87 | 2.6 | 1368071_at |
| Ddt | 2.6 | 1367793_at |
| Arg1 | 2.5 | 1368266_at |
| --- | 2.5 | 1373162_at |
| --- | 2.5 | 1385561_at |
| --- | 2.5 | 1389074_at |
| --- | 2.4 | 1376265_at |
| Pdcd8 | 2.4 | 1370321_at |
| --- | 2.4 | 1392604_at |
| Sec23a | 2.4 | 1388755_at |
| Cd59 | 2.4 | 1367929_at |
| --- | 2.4 | 1371875_at |
| --- | 2.4 | 1389394_at |
| Tmlhe | 2.4 | 1387357_at |
| --- | 2.4 | 1388788_at |
| --- | 2.4 | 1377096_at |
| --- | 2.3 | 1372510_at |
| --- | 2.3 | 1390387_at |
| --- | 2.3 | 1374584_at |
| Cdtw1 | 2.3 | 1387636_a_at |
| Cpt2 | 2.3 | 1386927_at |
| Adk | 2.3 | 1369629_at |
| Rbp1 | 2.3 | 1367939_at |
| --- | 2.3 | 1377145_at |
| Acadm | 2.3 | 1367702_at |
| --- | 2.3 | 1371919_at |

| Gensymbol | Induktion | Probenstet |
|-----------|-----------|------------|
| --- | 2.3 | 1398384_at |
| Gamt | 2.3 | 1368253_at |
| --- | 2.3 | 1383080_at |
| Defb1 | 2.3 | 1369660_at |
| Gpd3 | 2.2 | 1369560_at |
| --- | 2.2 | 1390378_at |
| Slc25a1 | 2.2 | 1367773_at |
| --- | 2.2 | 1372136_at |
| --- | 2.2 | 1388358_at |
| --- | 2.2 | 1374568_at |
| Etfdh | 2.2 | 1371519_at |
| --- | 2.2 | 1373198_at |
| Got2 | 2.2 | 1367819_at |
| --- | 2.2 | 1389642_at |
| --- | 2.2 | 1386466_at |
| --- | 2.2 | 1373335_at |
| Ocln | 2.2 | 1370821_at |
| --- | 2.1 | 1377357_at |
| --- | 2.1 | 1377601_at |
| Mipep | 2.1 | 1369023_at |
| Adk | 2.1 | 1369630_at |
| --- | 2.1 | 1371560_at |
| --- | 2.1 | 1389345_at |

Tabelle IV: Nur von HNF4 α herunterregulierte Probenstets

| Gensymbol | Induktion | Probenstet |
|-----------|-----------|--------------|
| --- | 0.19 | 1377506_at |
| Atp2a3 | 0.24 | 1371165_a_at |
| Ngfr | 0.26 | 1368148_at |
| Loc192280 | 0.28 | 1371161_at |
| --- | 0.28 | 1390250_x_at |
| --- | 0.31 | 1374236_at |
| Tmeff1 | 0.32 | 1377772_at |
| --- | 0.32 | 1372537_at |
| --- | 0.33 | 1373710_at |
| Arrb2 | 0.33 | 1370265_at |
| --- | 0.34 | 1390640_at |
| --- | 0.34 | 1378367_at |
| --- | 0.35 | 1392941_at |
| Cdh23 | 0.35 | 1368970_at |
| --- | 0.35 | 1373223_at |
| --- | 0.35 | 1373977_at |
| --- | 0.36 | 1372624_at |
| --- | 0.36 | 1373751_at |
| --- | 0.37 | 1379380_at |
| --- | 0.37 | 1375206_at |
| Soat1 | 0.38 | 1374976_a_at |
| --- | 0.38 | 1388963_at |
| --- | 0.38 | 1372637_at |
| Hip1 | 0.39 | 1389132_at |
| Map1b | 0.39 | 1373363_at |

| Gensymbol | Induktion | Probenaset |
|-----------|-----------|--------------|
| Tspan2 | 0.39 | 1368104_at |
| Ccnd1 | 0.40 | 1383075_at |
| Pfkip | 0.40 | 1372182_at |
| --- | 0.40 | 1373399_at |
| Hip1 | 0.41 | 1390082_at |
| Nfl | 0.41 | 1370059_at |
| Bambi | 0.42 | 1370823_at |
| --- | 0.42 | 1388464_at |
| Rab26 | 0.43 | 1369004_at |
| Calb1 | 0.43 | 1370201_at |
| --- | 0.43 | 1374575_at |
| --- | 0.44 | 1372084_at |
| Slc1a1 | 0.44 | 1370367_at |
| --- | 0.44 | 1388666_at |
| Tc10 | 0.45 | 1367874_at |
| --- | 0.45 | 1376215_at |
| Hap1 | 0.46 | 1369358_a_at |
| Dbn1 | 0.46 | 1368404_at |
| Hip1 | 0.46 | 1388193_at |
| Eno2 | 0.47 | 1370341_at |
| Sncb | 0.47 | 1371568_at |
| Shank2 | 0.48 | 1369777_a_at |

Tabelle AV: Nur von HNF4 α 8 hochregulierte Probensets

| Gensymbol | Induktion | Probenaset |
|-----------|-----------|------------|
| --- | 11.4 | 1389645_at |
| Maf | 8.5 | 1387165_at |
| --- | 5.8 | 1375924_at |
| Ttr | 4.9 | 1367598_at |
| --- | 4.2 | 1389943_at |
| --- | 3.9 | 1390472_at |
| Dri42 | 3.5 | 1370950_at |
| Serpina10 | 3.2 | 1368790_at |
| Anpep | 3.2 | 1386938_at |
| LOC59114 | 3.0 | 1370032_at |
| Id2 | 2.9 | 1375532_at |
| --- | 2.8 | 1383241_at |
| --- | 2.5 | 1373480_at |
| Gclc | 2.4 | 1372523_at |
| --- | 2.3 | 1372655_at |
| RT1.S3 | 2.3 | 1388164_at |
| Ceacam1 | 2.3 | 1374620_at |
| Gabrd | 2.3 | 1369048_at |
| Heph | 2.2 | 1368533_at |
| --- | 2.2 | 1389474_at |
| --- | 2.2 | 1390366_at |
| Folr1 | 2.2 | 1387889_at |
| Gro1 | 2.1 | 1387316_at |
| Facl2 | 2.1 | 1388153_at |

| Gensymbol | Induktion | Probenet |
|-----------|-----------|------------|
| Ctsc | 2.0 | 1374778_at |
| --- | 1.8 | 1388611_at |

Tabelle AVI: Nur von HNF4 α 8 herunterregulierte Probenets

| Gensymbol | Induktion | Probenet |
|-----------|-----------|--------------|
| --- | 0.47 | 1374160_at |
| --- | 0.46 | 1376966_at |
| --- | 0.44 | 1373152_at |
| --- | 0.43 | 1371692_at |
| Rasd1 | 0.41 | 1387908_at |
| Cxcr4 | 0.28 | 1370097_a_at |
| --- | 0.24 | 1390403_at |

Tabelle AVII: Bereits vor der Induktion durch transgenes HNF4 α regulierte GeneHochregulierte Gene**HNF4 α 2**

| Gensymbol | Induktion | Probenset |
|------------|-----------|--------------|
| Abcb1a | 59,7 | 1370464_at |
| Lgals2 | 45,6 | 1368278_at |
| Aqp2 | 33,2 | 1368568_at |
| *Loc192280 | 29,0 | 1371161_at |
| *--- | 12,6 | 1374222_at |
| Tff3 | 12,0 | 1387218_at |
| *Apob | 9,0 | 1388190_at |
| S100a6 | 7,8 | 1367661_at |
| --- | 7,4 | 1377168_at |
| *Ramp1 | 7,1 | 1367791_at |
| Sepp1 | 7,1 | 1368806_at |
| Lfg | 6,6 | 1370625_at |
| *Aldob | 6,4 | 1370299_at |
| *Cyp4f14 | 6,1 | 1368467_at |
| *Espn | 5,4 | 1368774_a_at |
| *Gpd3 | 4,8 | 1369560_at |
| Gpd3 | 3,0 | 1371363_at |
| --- | 4,4 | 1376359_at |
| *ErbB3 | 4,1 | 1377821_at |
| Rad53 | 3,9 | 1369010_at |
| Tgfb3 | 3,8 | 1387484_at |
| --- | 3,8 | 1375170_at |
| C1galt1 | 3,8 | 1387446_at |
| Gpr88 | 3,8 | 1387241_at |
| --- | 3,5 | 1374752_at |
| --- | 3,4 | 1393113_at |
| *Myo5b | 3,3 | 1368355_at |
| Serpine2 | 3,2 | 1372440_at |
| Hs3st1 | 3,2 | 1370834_at |
| Fgf13 | 3,2 | 1368114_at |
| LOC59114 | 3,0 | 1370032_at |
| Pkib | 3,0 | 1387459_at |
| Pkib | 2,7 | 1369105_a_at |
| --- | 2,9 | 1388786_at |
| --- | 2,9 | 1371988_at |
| *--- | 2,8 | 1389354_at |
| LOC207126 | 2,7 | 1388006_at |
| Lgals9 | 2,7 | 1387027_a_at |
| --- | 2,7 | 1376804_at |
| --- | 2,6 | 1389718_at |
| Lgals5 | 2,6 | 1369716_s_at |
| *--- | 2,5 | 1375954_at |
| Vdup1 | 2,5 | 1371131_a_at |
| --- | 2,5 | 1376628_at |
| Igfbp1 | 2,3 | 1368160_at |
| *Gss | 2,2 | 1370365_at |

HNF4 α 8

| Gensymbol | Induktion | Probenset |
|-----------|-----------|--------------|
| Lgals2 | 47,8 | 1368278_at |
| Emp1 | 7,5 | 1371527_at |
| *--- | 7,5 | 1374222_at |
| Emp1 | 6,6 | 1369736_at |
| *Aldob | 6,5 | 1370299_at |
| Tff3 | 5,4 | 1387218_at |
| --- | 4,8 | 1375170_at |
| Sepp1 | 4,4 | 1368806_at |
| *--- | 4,0 | 1376226_at |
| Cyp4f14 | 3,8 | 1368467_at |
| *Ramp1 | 3,8 | 1367791_at |
| Lfg | 3,8 | 1370625_at |
| Espn | 3,6 | 1368774_a_at |
| --- | 3,2 | 1377168_at |
| *Guca2b | 3,1 | 1387253_at |
| Gpd3 | 2,9 | 1369560_at |
| Gpd3 | 2,3 | 1371363_at |
| Mustang | 2,7 | 1373032_at |
| --- | 2,6 | 1376359_at |
| Ephx1 | 2,4 | 1387669_a_at |
| Rad53 | 2,3 | 1369010_at |

Herunterregulierte Gene**HNF4 α 2**

| Gensymbol | Induktion | Probenaset |
|-----------|-----------|--------------|
| Vtn | 0,08 | 1368380_at |
| Alb | 0,09 | 1367556_s_at |
| Alb | 0,16 | 1367555_at |
| PAIHC3 | 0,11 | 1387291_at |
| Ins2 | 0,15 | 1370077_at |
| Sytl4 | 0,18 | 1369457_a_at |
| --- | 0,20 | 1376726_at |
| Enpp1 | 0,24 | 1370047_at |
| Fga | 0,26 | 1371258_at |
| --- | 0,29 | 1374966_at |
| --- | 0,29 | 1390671_at |
| --- | 0,30 | 1374168_at |
| Csrp2 | 0,32 | 1370282_at |
| Npy | 0,36 | 1387154_at |
| --- | 0,37 | 1373043_at |
| --- | 0,37 | 1382944_at |
| --- | 0,38 | 1377016_at |
| Oat | 0,38 | 1367729_at |
| Tagln3 | 0,39 | 1387529_a_at |
| *Maob | 0,41 | 1368514_at |
| --- | 0,41 | 1390226_at |
| Ckmt1 | 0,43 | 1390566_a_at |

HNF4 α 8

| Gensymbol | Induktion | Probenaset |
|-----------|-----------|--------------|
| Alb | 0,03 | 1367555_at |
| Tf | 0,03 | 1370228_at |
| Mug1 | 0,05 | 1370027_a_at |
| Knq | 0,05 | 1387050_s_at |
| Alb | 0,06 | 1367556_s_at |
| Atpi | 0,09 | 1370349_a_at |
| Fga | 0,09 | 1370992_a_at |
| Atpi | 0,11 | 1370396_x_at |
| Apoc1 | 0,11 | 1368587_at |
| --- | 0,14 | 1388469_at |
| Atpi | 0,14 | 1370350_x_at |
| Cyp2c13 | 0,18 | 1370495_s_at |
| Spin2c | 0,18 | 1368224_at |
| Fabp1 | 0,19 | 1369111_at |
| A2m | 0,22 | 1367794_at |
| Apoc3 | 0,22 | 1370009_at |
| Orm1 | 0,23 | 1368731_at |
| Apoe | 0,23 | 1370862_at |
| Ahsg | 0,24 | 1368161_a_at |
| *Fgb | 0,25 | 1370511_at |
| C3 | 0,26 | 1368000_at |
| Hp | 0,28 | 1370148_at |
| Fgg | 0,29 | 1370086_at |
| Fga | 0,30 | 1371258_at |
| Cp | 0,37 | 1368420_at |

* Diese Gene sind auch Zielgene von HNF4 α 2 bzw. HNF4 α 8 in den Microarray Analysen.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, die gewährten Freiräum und die gute Betreuung. Außerdem für die berühmten Laborfeste, einen unvergessliches Fest in der Schweiz und die Einführung in die schweizer Kultur.

Frau Dr. Heike Thomas für die Einführung in die Geheimnisse der Zellbiologie, die vielen interessanten Diskussionen, die fachliche und moralische Unterstützung und die gute Betreuung.

Herrn PD. Dr. Ludger Klein-Hitpass für die Durchführung der Microarray-Analysen und die wertvolle Hilfe bei deren Auswertung.

Herrn Klaus Lennartz für seine Unterstützung am FACS und viele interessante Diskussionen über die Zellsortierung und vieles andere.

Sabine Senkel, Gülüzar Turan und Tanja Arndt für die gute Zusammenarbeit, für ihre tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur und immer wenn mal Not am Manne war und für die wertvollen Ideen und Tips für die molekularbiologische und zellbiologische Arbeit.

Belén Lucas für die gute Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch, ihre stetige Hilfsbereitschaft, die vielen interessanten Diskussionen sowie die vielen guten Ideen und Anregungen, die sie mit mir geteilt hat.

Dr. Heike Thomas, Dr. Silvia Bohn, Dr. Daniela Plitzko, Dr. Kenneth Simon, Simone Roosen, Dr. Christoph Waldner, Dr. Guizhi Wu, Belén Lucas, Gülüzar Turan, Tanja Arndt, David Nickol, Sabine Senkel, Karen Grigo, Karin Dudziak, Magdalena Roose, Klaus Lennartz und der ganzen AGIII für die gute Arbeitsatmosphäre, viele lustige Stunden und Feste, die Hilfsbereitschaft, moralische Unterstützung und Freundschaft.

Lebenslauf

Name: Silke Erdmann

Anschrift: Burgschmietstraße 17
90419 Nürnberg

Geburtsdatum: 13.8.1974

Geburtsort: Düsseldorf

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981-1985 Kath. Grundschule „Im Grund“ in
Düsseldorf
1985-1994 „Theodor-Fliedner-Gymnasium“ in
Düsseldorf
1991-1992 Northampton High School, Northampton,
PA, USA

Hochschulstudium: 1994-1999 Studium der Biochemie an der
Ruhr-Universität-Bochum
Abschluß: Diplom-Biochemikerin

Diplomarbeit: Dezember 1998 - November 1999 am
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Abteilung Strukturelle Biologie, Arbeitsgruppe
Tumorgenetik, in Dortmund
Thema: Analyse tumorspezifischer Genexpression

Mai 2000 - April 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik,
Abteilung Ropers, in Berlin

Juni 2001 - November 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Universitätsklinikum Essen, Institut für Zellbiologie,
AG Entwicklungsbiologie

seit Februar 2005 Clinical Research Associate bei der SKM Oncology
Research GmbH, in Fürth

Essen, den

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α hemmt die Proliferation und induziert Apoptose in der β -Zelllinie INS-1“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Silke Erdmann befürworte.

Essen, den

Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Silke Erdmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Silke Erdmann